UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

RICARDO BELTRAME DE OLIVEIRA

"PROLIFERAÇÃO E DISFUNÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELITO TIPO 2. ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA."

	Este exemplar corresponde à redação final
	da tese defendida pelo(a) candidato (a)
	ficardo Beltrame
	de Oliveira
	e aprovada pela Comissão Julgadora.
<	Challey 31393

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

 OL4p
Oliveira, Ricardo Beltrame de Proliferação e disfunção da célula beta pancreática em modelo animal de Diabetes Melito Tipo 2. Envolvimento da via de sinalização WNT/Beta-Catenina / Ricardo Beltrame de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.
Orientador: Carla Beatriz Collares Buzato. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Células beta pancreáticas. 2. Diabetes Mellitus Tipo 2.
3. Beta catenina. 4. Insulina – Secreção. 5. Células – Proliferação. 6. Langerhans, ilhotas de. 7. Dieta hiperlipídica.
I. Collares-Buzato, Carla Beatriz, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Titule and incline. Descretis bats call proliferation and dusting time in animal model.

Título em inglês: Pancreatic beta cell proliferation and dysfunction in animal model of type 2 Diabetes Mellitus. Involvement of the WNT/Beta-catenin signaling pathway.

Palavras-chave em ingles: Pancreatic beta cells; Type 2 Diabetes Mellitus; Beta catenin; Insulin secretion; Cell proliferation; Islets of Langerhans; High fat diet.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Carla Beatriz Collares Buzato, Maria Esméria Corezola do Amaral, Ivanira José Bechara.

Data da defesa: 20/04/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 20 de Abril de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato (Orientadora)

Profa. Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral

Assinatura

ME Assinatura

Profa. Dra. Ivanira José Bechara

Profa. Dra. Luciana Le Sueur Maluf

Profa. Dra. Thalita Rocha

SvanigezeBechare Assinatura

Assinatura

Assinatura

Às pessoas que mais admiro: MEUS PAIS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre nos dá forças para alcançar nossos objetivos.

Aos meus pais, Clara e Carlos e ao meu irmão Guilherme pela incansável dedicação, amor e carinho que recebi por toda a vida, certamente se não fosse por eles eu não conseguiria chegar até aqui.

À minha orientadora Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato, a quem sou muito grato por todo apoio, ensinamentos, compreensão e por acreditar e confiar em mim ao abrir as portas de seu laboratório.

À minha querida amiga-irmã Karine "Kate", que compartilhou todas minhas conquistas e que sempre me deu forças diante dos reveses, com muita paciência e bom humor.

À querida amiga e Profa. Carol, pelos ensinamentos, companheirismo, suporte, sendo a grande responsável por todo o meu desenvolvimento técnico no laboratório e crescimento pessoal na vida acadêmica.

Aos amigos do laboratório, Junia, Carla Polo, Daniela, Mariane, Vanessa e Viviane, agradeço por toda ajuda na bancada e por tornarem os meus dias mais divertidos.

Aos amigos da graduação, especialmente à Mariana minha eterna dupla, sem sua amizade e confiança a graduação não teria sido tão boa.

Aos técnicos do departamento de Histologia e Embriologia, especialmente à Marta e à Célia pela imensa ajuda neste trabalho.

Aos Profs. e alunos do departamento de Histologia e Embriologia, pelo companheirismo ajuda e disponibilidade prestada.

Aos Profs. Boschero e Everardo do departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísca por ceder seus laboratórios para o desenvolvimento de parte dos meus experimentos. À Marise e aos alunos do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo por toda ajuda prestada.

Aos Profs. membros da banca avaliadora que prontamente aceitaram fazer parte da mesma.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade concedida, especialmente à Liliam pela atenção e ajuda burocrática.

Agradeço também às agências de fomento Capes pela concessão de bolsa e à FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

RESUMO

Tem havido um grande interesse na determinação das vias envolvidas na proliferação e função/disfunção da célula beta e a aplicação deste conhecimento em terapias moleculares e celulares da diabetes. A patogênese da diabetes melito tipo 2 (T2DM) é complexa, mas frequentemente está associada com obesidade e distúrbios do metabolismo de lipídios (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia). A T2DM envolve o desenvolvimento de um quadro de resistência periférica à insulina parcialmente compensada por hiperinsulinemia e hiperplasia da célula beta pancreática, resultando em intolerância à glicose e hiperglicemia. Os mecanismos interligando os estados de obesidade/hipercolesterolemia e resistência à insulina ao fenômeno da hiperplasia da célula beta não são completamente conhecidos.

A presente dissertação teve como objetivos: 1) caracterizar um modelo animal adequado para se estudar a proliferação e disfunção da célula beta pancreática, e 2) avaliar, no pâncreas endócrino desses animais, a possível ativação da via de sinalização Wnt/beta-catenina, conhecida por estar envolvida no processo de proliferação celular em outros tecidos/órgãos. Para tal, foram empregados camundongos C57BL/6, wild-type (WT) e knockout para receptor de lipoproteína LDL (LDLr-/-), os quais foram submetidos à dieta hiperlipídica (HF) por 60 dias. Após a dieta HF, os animais WT tornaram-se obesos e hipercolesterolêmicos, bem como moderadamente hiperglicêmicos, hiperinsulinêmicos, intolerantes à glicose e resistentes à insulina, caracterizando-os como pré-diabéticos. Além disso, os animais alimentados com dieta HF apresentaram uma diminuição significativa na resposta secretora das células beta à glicose. De modo geral, os animais LDLr-/- apresentaram uma susceptibilidade relativamente mais alta à dieta HF, sugerida pela acentuada hipercolesterolemia, intolerância à glicose, e reduzida secreção de insulina estimulada por glicose observadas nestes animais. No entanto, a dieta HF induziu, de forma semelhante em animais WT e LDLr-/-, uma diminuição significativa no conteúdo celular de Cx36, uma proteína associada à junção comunicante e um marcador de diferenciação terminal da célula beta. Ambos os grupos WT e LDLr-/- alimentados com dieta HF mostraram aumento na proliferação de células beta, como avaliada pela imunomarcação das ilhotas para a proteína Ki67, mas apenas os animais WT exibiram alterações morfométricas indicativas de hiperplasia do pâncreas endócrino, tais como aumento na massa total de ilhotas e de células beta. Uma vez estabelecido que camundongos WT alimentados com dieta HF por 60 dias consistiam em um modelo adequado para a segunda etapa deste estudo, fomos investigar a possível ativação da via Wnt/beta-catenina nas ilhotas pancreáticas desses animais, avaliando-se a distribuição e expressão celular das proteínas beta-catenina total, beta-catenina ativada, c-Mvc e ciclina D. A análise por imunofluorescência para beta-catenina não mostrou acúmulo citoplasmático ou translocação para o núcleo desta proteína em ilhotas pancreáticas, que poderia indicar ativação da via Wnt/beta-catenina no nosso modelo de hiperplasia do pâncreas endócrino. No entanto, a análise por Western Blot revelou um aumento significativo na expressão de beta-catenina ativada e ciclina D em ilhotas de animais alimentados com dieta HF em relação ao grupo controle.

Concluindo, a dieta HF por 60 dias induz alterações metabólicas típicas da pré-diabetes em animais WT e LDLr-/-. O estado de pré-diabetes está associado a uma diminuição da expressão de Cx36 nas células beta pancreáticas, sugerindo um possível papel da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes na patogênese da T2DM. A maior susceptibilidade metabólica à dieta HF apresentada por camundongos LDLr-/-, em relação aos WT, pode ser explicada pela maior deficiência na secreção de insulina em resposta à glicose e ausência de hiperplasia compensatória do pâncreas endócrino. Ainda, a análise preliminar de expressão protéica de algumas proteínas da via Wnt/beta-catenina sugere que esta via parece estar ativada durante o processo de hiperplasia do pâncreas endócrino observada no nosso modelo animal.

ABSTRACT

The pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (T2DM) is often associated with obesity and dyslipidemia (hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia). T2DM involves intolerance to glucose and insulin resistance partially compensated by hyperinsulinemia and pancreatic beta cell hyperplasia. The mechanisms linking obesity/hypercholesterolemia and insulin resistance to beta cell hyperplasia are not fully known. The Wnt/beta-catenin signaling pathway has been reported to be involved in cell growth and differentiation in several tissues/organs but its role in endocrine pancreas development and function is still unclear.

This work aimed at: 1) establishing an appropriate animal model of T2DM to study pancreatic beta cell proliferation and dysfunction and, 2) investigating a putative involvement of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the beta cell hyperplasia in this model. To this end, we employed C57BL/6 wild-type (WT) and LDL lipoprotein receptor knockout (LDLr-/-) mice, fed a high fat (HF) diet for 60 days. After feeding a HF diet, WT mice became obese, hypercholesterolemic and moderately hyperglycemic, hyperinsulinemic, glucose intolerant and insulin resistant, characterizing them as pre-diabetics. Moreover, animals fed a HF diet showed a significant decrease in beta-cell secretory response to glucose. In general, LDLr-/- animals showed a relatively higher susceptibility to HF diet, as suggested by a marked hypercholesterolemia, glucose intolerance and reduced insulin secretion stimulated by glucose observed in these animals as compared to the control ones. However, HF diet induced similarly in both WT and LDLr-/- mice a significant decrease in cellular content of Cx36, a gap junctional protein and marker of terminally differentiated beta cell. Both WT and LDLr-/- fed a HF diet showed increased proliferation of beta cells, as assessed by Ki67 immunostaining, but only WT mice exhibited morphometric changes indicative of endocrine pancreas hyperplasia, such as increased total islet and beta cell masses. After we investigated a possible activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in these hyperplasic pancreatic islets of WT animals fed a HF diet. This was done by assessing the distribution and cellular protein expression of some proteins associated to this pathway (i.e., total and activated beta-catenin, c-Myc and cyclin D) in islets of our animal model. Beta-catenin immunofluorescence showed no cytoplasmic accumulation or translocation into the nucleus of beta cells in HF-fed mice. However, immunoblotting revealed a significant increase of unphosphorylated beta-catenin (activated) and cyclin D expression in islets of HF diet-fed animals when compared to its control group.

In conclusion, a HF diet for 60d induced pre-diabetes state in both WT and LDLr-/- mice. The pre-diabetes state is associated with a decreased expression of Cx36 in pancreatic beta cells, suggesting a possible role of intercellular communication mediated by gap junctions in the pathogenesis of T2DM. The relatively high metabolic susceptibility to the HF diet showed by LDLr-/- mice, as compared to WT, may be explained by a marked impairment of glucose-stimulated insulin secretion and a lack of compensatory hyperplasia of the endocrine pancreas. In addition, the protein expression analysis suggests that the Wnt/beta-catenin pathway may be activated during the islet hyperplasia process in our animal model.

LISTA ABREVIATURAS

APC – Proteína Polipose Adenoma de Colo (do inglês, Adenomatous Polyposis Coli).

CK1 – Proteína Caseína-cinase 1 (do inglês, Casein Kinase 1).

Cx36 – Proteína de junção comunicante, Conexina 36.

Dsh – Proteína Dishevelled (*Dishevelled Protein*).

GJIC – Junções comunicantes intercelulares (do inglês, *Gap Junction Intercellular Communication*).

GSK3 β – Glicogênio-sintase-cinase 3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3* β).

GTT - Teste de Tolerância à Glicose Oral (do inglês, Glucose Tolerance Test).

HF, dieta - dieta hiperlipídica (do inglês, High-Fat).

ITT - Teste de Tolerância à Insulina (do inglês, Insulin Tolerance Test).

LDLr-/- - Camundongos C57BL/6 knockout para receptor de lipoproteína LDL.

LF, dieta – Dieta padrão (do inglês, *Low-Fat*).

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade.

LRP – Proteína relacionada à LDL (do inglês, *Low-density lipoprotein receptor Related Protein*).

RT – Temperatura ambiente (do inglês, *Room Temperature*).

T2DM - Diabetes Melito tipo 2 (do inglês, Type 2 Diabetes Mellitus).

TA – Temperatura ambiente.

TCF/LEF1 – Proteína de regulação gênica (do inglês, *T Cell specific Fator/Lymphoid Enhancer-binding Factor1*).

WT - camundongos C57BL/6 selvagem (do inglês, Wild-Type).

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 Estrutura Da Dissertação	.14		
2 INTRODUÇÃO AO TEMA DA DISSERTAÇÃO	.14		
2.1 PÂCREAS ENDÓCRINO – MORFOLOGIA E FUNÇÃO	.14		
2.2 PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA	.17		
2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO DA WNT/BETA-CATENINA	. 19		
2.4 Modelo Animal Da Diabetes Tipo 2	.21		
3 Objetivos E Justificativas			
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS			

CAPÍTULO II

DECREASED CX36 ISLET CONTENT AND IMPAIRED COMPENSATORY BETA CELL FUNCTION AND GROWTH IN RESPONSE TO HIGH FAT DIET IN LDL RECEPTOR KNOCKOUT MICE

1	INTRODUCTION	.30
2	MATERIALS AND METHODS	.31
	2.1 Animals And Diets	31
	2.2 Plasma Biochemical Analysis	.32
	2.3 TEST OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE (GTT) AND INSULIN TOLERANCE (ITT).	.32
	2.4 ISLET ISOLATION	.33

2.5 INSULIN SECRETION
2.6 WESTERN BLOT
2.7 Co-Localization OF Cx36 And Insulin
2.8 HISTOLOGICAL PROCESSING
2.9 Immunohistochemistry For Insulin And K167
2.10 TUNEL ASSAY
2.11 MORPHOMETRY
2.12 STATISTICAL ANALYSES
3 RESULTS
3.1 HIGH FAT DIET AND DEFICIENCY OF LDLR RESULT IN HYPERCHOLESTEROLEMIA AND DISTURBANCES OF GLUCOSE HOMEOSTASIS
3.2 HIGH FAT DIET AND LDLR-/- DEFICIENCY INDUCE REDUCED GLUCOSE- STIMULATED INSULIN SECRETION BY ISOLATED PANCREATIC ISLETS
3.3 DECREASED INSULIN SECRETION INDUCED BY HF-DIET WAS ASSOCIATED WITH A REDUCTION IN GAP JUNCTIONAL CX36 ISLET CONTENT IN BOTH LDLR-/- AND WT ISLETS
3.4 LACK OF COMPENSATORY HYPERPLASIA OF THE ENDOCRINE PANCREAS IN PREDIABETIC LDLR-/- MICE
4 DISCUSSION
5 FIGURES
6 References

CAPÍTULO III

Possível Envolvimento Da Via De Sinalização Wnt/Beta-Catenina Na Hiperplasia Compensatória Da Célula Beta Pancreática Em Modelo Animal De Diabetes Tipo 2

1 Introdução61				
2 MATERIAL E MÉTODOS				
2.1 Animais				
2.2 DIETA				
2.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO PÂNCREAS63				
2.4 Imunoistoquímica Para Beta-Catenina Ou Insulina				
2.5 Morfometria Do Pâncreas Endócrino65				
2.6 Índice De Proliferação Celular No Pâncreas Endócrino66				
2.7 CO-LOCALIZAÇÃO DE BETA-CATENINA E INSULINA EM CORTES DE CONGELAMENTO DE PÂNCREAS				
2.8 Isolamento De Ilhotas Pancreáticas67				
2.9 WESTERN BLOT				
2.10 Análise Estatística				
3 RESULTADOS				
4 DISCUSSÃO71				
5 FIGURAS				
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS				

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Via de Sinalização Wnt/beta-catenina......20

CAPÍTULO II

Figure 1. Plasma cholesterol, glucose, insulin levels and body weight gain in wild-type (WT) and LDLr-knockout (LDLr-/-) mice after high fat diet (HF)47
Figure 2. Glucose and insulin tolerance test in WT and LDLr-/- mice fed a high fat diet (HF)
Figure 3. Glucose-stimulated insulin secretion in islets from WT and LDLr-/- mice fed a low fat (LF) or high fat diet (HF)
Figure 4. Cx36 distribution and cell content in the endocrine pancreas of WT and LDLr-/- mice fed a low fat (LF) or a high fat diet (HF)
Figure 5. Histological and morphometric analysis of pancreas from WT and LDLr-/- mice fed a low fat (LF) or high fat diet (HF)
Figure 6. Beta cell proliferation, as assessed by Ki67 immunolabelling, in pancreatic islets from WT and LDLr-/- mice after low fat (LF) or high fat diet (HF)
Figure 7. Neogenesis in the endocrine pancreas of WT and LDLr-/- mice fed a low fat (LF) or a high diet (HF)
Figure 8. Apoptosis index, assessed by TUNEL technique, in pancreatic islets from WT and LDLr-/- mice after low fat (LF) or high fat diet (HF)

CAPÍTULO III

Figura1.	Imunolocalização	o de bet	a-catenina	em	cortes	histológicos	de	pâncreas	endócrino
de ca	amundongos subn	netidos à	à dieta nor	mal	ou hipe	rlipídica (H	F)	•••••	75

INTRODUÇÃO

1 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em quatro capítulos. O atual capítulo apresenta uma visão geral do tema, descrevendo de forma sucinta o pâncreas endócrino com ênfase à biologia da célula beta e a via de sinalização Wnt/beta-catenina, e define os objetivos e justificativas da dissertação. O capítulo II aborda, na forma de artigo científico, os resultados da caracterização metabólica e a repercussão da dieta hiperlipídica no modelo animal diabetes tipo 2, C57BL/6 *wild-type* (WT) e *knockout* para receptor de LDL (LDLr-/-). A seguir, o capítulo III apresenta, também na forma de artigo científico, os resultados da possível ativação da via Wnt/beta-catenina em animais que apresentam hiperplasia do pâncreas endócrino após dieta hiperlipídica. Por fim, no capítulo IV são apresentadas as conclusões gerais obtidas com o desenvolvimento desta dissertação.

2 INTRODUÇÃO AO TEMA DA DISSERTAÇÃO

2.1 PÂNCREAS ENDÓCRINO – MORFOLOGIA E FUNÇÃO

O pâncreas é uma glândula mista, com função tanto endócrina como exócrina. A porção endócrina é composta por unidades morfo-funcionais denominadas ilhotas de Langerhans, as quais são constituídas por cinco tipos celulares secretores de diferentes hormônios envolvidos, direta e indiretamente, na homeostase glicêmica: 1) células beta ou B, responsáveis pela secreção de insulina, importante hormônio de ação hipoglicemiante, que induz a captação de glicose da corrente sanguínea pelos tecidos/órgãos para sua metabolização intracelular; 2) célula alfa ou A, responsável pela secreção do hormônio glucagon de função hiperglicemiante; 3) célula delta ou D, responsáveis pela secreção de somatostatina, hormônio de ação parácrina, que regula a liberação de insulina e glucagon; 4) célula PP, que parece exercer uma função inibidora na secreção do pâncreas exócrino; 5)

célula épsilon ou E, produtoras de grelina, relacionada à inibição da secreção de insulina (Andralojc *et al.*, 2009; Ekblad & Sundler, 2002; Kanno *et al.*, 2002; Orci, 1976).

Histologicamente, a ilhota apresenta um formato arredondado ou ovalado, revestida por uma delicada cápsula de tecido conjuntivo frouxo rico em fibras reticulares, e seu parênquima é constituído por cordões das células endócrinas entremeados por uma rica rede de capilares sanguíneos do tipo fenestrado. Com relação à disposição ou arranjo das células endócrinas na ilhota, em roedores, as células beta ocupam a região central, células alfa, delta e épsilon localizam-se na periferia da ilhota. As células PP também estão, preferencialmente, dispostas na periferia da ilhota (Andralojc *et al.*, 2009; Orci, 1976).

Tanto a histologia como a citoarquitetura ou arranjo preferencial dos tipos celulares dentro da ilhota de várias espécies, incluindo a humana, parece ser fundamental para o seu funcionamento. A organização histológica e arranjos celulares das ilhotas modificam-se ao longo do desenvolvimento animal, paralelamente à maturação funcional do pâncreas endócrino (Carvalho *et al.*, 2006). Alterações na morfologia e citoarquitetura normal das ilhotas são observadas em animais com quadro estabelecido de diabetes ou em modelos *in vitro* de disfunção secretora de insulina (Wong *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2001; Cirulli *et al.*, 1993).

Em cada ilhota, as diferentes células endócrinas se conectam, de forma homotípica ou heterotípica, por meio das junções intercelulares do tipo oclusão, comunicante, aderente e desmossomos, como demonstrado por microscopia eletrônica (Orci, 1976; Orci *et al.* 1975). Tais contatos intercelulares parecem ser cruciais para o perfeito funcionamento deste órgão, em especial para a secreção de insulina pela célula beta. Há evidências que as junções celulares e suas proteínas constitutivas participem de processos tais como a adesão e homeostase celular, bem como da organização e citoarquitetura das ilhotas (Collares-Buzato *et al.*, 2001; Cirulli *et al.*, 1993; Orci, 1976; Orci *et al.*, 1975).

Dentre as junções intercelulares, a junção comunicante foi a mais estudada no pâncreas endócrino, sendo documentada a presença de dois principais subtipos de conexinas que compõem os canais intercelulares desta junção nas células endócrinas

pancreáticas: a conexina 43 (Cx43) e a conexina 36 (Cx36) (Serre-Beinier *et al.*, 2000; Vozzi et al., 1995; Meda et al., 1991). Evidências têm destacado a importância do acoplamento das células beta mediado pelas junções comunicantes no controle da biossíntese e secreção de insulina. Células beta isoladas das ilhotas pancreáticas mostram significante comprometimento da resposta secretória estimulada de insulina que é revertido quando do restabelecimento destes contatos intercelulares (Bosco & Meda, 1997; Pipeleers et al., 1994; 1982; Halban et al., 1982). Diversos procedimentos experimentais conhecidos por induzirem significativa secreção pancreática de insulina, como exposição a altas concentrações de glicose, a certas drogas como glibenclamide e o tratamento com o hormônio prolactina induzem significante aumento na expressão de conexina e no acoplamento das células beta mediado pelas junções comunicantes (Collares-Buzato et al., 2001; Sorenson et al., 1987; Meda et al., 1979). Trabalhos, empregando a linhagem de células beta, MIN6, transfectadas com cDNA anti-sense para Cx36, ou camundongos transgênicos, mostram que a perda da expressão de Cx36 pelas células beta pancreáticas resulta em comprometimento da sincronização das oscilações intracelulares de cálcio, em secreção basal aumentada de insulina e resposta secretora deficitária de insulina a concentrações fisiológicas de glicose e a outros secretagogos (Wellershaus et al., 2008; Ravier et al., 2005; Calabrese et al., 2003). Recentemente, demonstramos que a expressão de Cx36 aumenta significantemente durante o processo de maturação da célula beta em condições in vitro e in vivo (Carvalho et al., 2010; Leite et al., 2005; Collares-Buzato et al., 2001).

Além das junções comunicantes, dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que as células endócrinas pancreáticas expressam também proteínas reconhecidamente associadas às junções de adesão (caderinas, α - e β -cateninas) e de oclusão (ZO-1), e que tal expressão pode ser regulada tanto *in vitro* como *in vivo*. Demonstramos que ilhotas de ratos recém-nascidos sofrem maturação parcial do processo de secreção de insulina em cultura, na presença e ausência de prolactina e, paralelamente, expressam quantidade aumentada de proteínas associadas à junção aderente (incluindo a beta-catenina) e de oclusão, mas não do citoesqueleto (vinculina e beta-actinina) (Collares-Buzato *et al.* 2004, 2001). Ainda, a

expressão juncional dessas proteínas parece aumentar ao longo do desenvolvimento do pâncreas endócrino em ratos, correlacionando-se com a aquisição da resposta secretória de insulina induzida pela glicose nestes animais (Martins *et al.*, 2006). Entretanto, ainda não está estabelecido se essas junções intercelulares e suas proteínas constitutivas têm um papel adicional ao de adesão intercelular, como, por exemplo, nos processos de proliferação e diferenciação da célula beta (Collares-Buzato, 2007).

2.2 PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA

A disfunção da célula beta e/ou a redução substancial do número deste tipo celular no pâncreas endócrino são determinantes na patogênese de todas as formas de diabetes. Estudos em modelos animais, entretanto, sugerem que a célula beta tem uma capacidade adaptativa supreendente frente a uma demanda aumentada de insulina, como no estado de resistência periférica e obesidade (Liew & Andrews, 2008; Sone & Kagawa, 2005). Nestes casos, há um incremento significativo na massa de célula beta. Os mecanismos intracelulares envolvidos no processo de proliferação e diferenciação da célula beta *in vivo* têm sido alvos de investigação por parte de grupos interessados na terapia celular para tratamento da diabetes (Liew & Andrews, 2008).

A indução de diferenciação de células beta é bastante complexa, uma vez que envolve a expressão regulada de diversos fatores de transcrição e proteínas dentre as quais se destacam o fator de transcrição Ngn3 (*Neurogenin 3*), Nkx2.2 e Nkx6.1 (fatores de transcrição do homeodomínio NK), além das proteínas transportador de glicose 2 (GLUT2), MafA e a Cx36 (Bavamian *et al.*, 2008; Ackerman & Gannon, 2007). A célula beta terminalmente diferenciada não somente expressa o gene da insulina mas principalmente é sensível à glicose, tendo capacidade de produzir e secretar quantidades adequadas do hormônio de acordo com a concentração plasmática deste monossacarídeo (Liew & Andrews, 2008).

A secreção de insulina pelas células beta pode ser também estimulada por outros secretagogos, tais como aminoácidos, ácidos graxos e acetilcolina (Guyton, 2006). O principal secretagogo estudado, no entanto, é a glicose que está envolvida nas vias de

secreção bifásica estimulada pela glicose, a via independente e dependente de canais de potássio sensíveis ao ATP. A ativação destas vias ocorre com o aumento da glicose plasmática, a qual é captada pela célula beta através do transportador GLUT-2 (Straub & Sharp, 2002). A secreção estimulada por glicose dependente de canais de potássio é iniciada com sua metabolização que ocasionará o aumento intracelular de ATP. Isto altera a relação ATP/ADP no citoplasma, levando ao fechamento dos canais de potássio ATP- dependentes. Ocorre, então, aumento na concentração de potássio intracelular e despolarização da membrana celular, desta forma há abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes com conseqüente aumento deste íon no interior da célula beta, levando à exocitose dos grânulos de insulina. (Liew & Andrews, 2008; Straub & Sharp, 2002). O comprometimento nas etapas de secreção da célula beta leva invariavelmente à disfunção secretória de insulina, podendo resultar em diabetes melito que, quando não tratada, desencadeia uma série de problemas decorrentes da falta de incorporação de glicose podendo levar à morte do portador (Guyton, 2006).

E sabido, entretanto, que as alterações metabólicas que precedem a diabetes tipo 2 são acompanhadas por alterações compensatórias do pâncreas endócrino, como aumento na secreção de insulina e hiperplasia/hipertrofia da célula beta (Sone & Kagawa, 2005). Há um grande interesse na determinação das vias envolvidas na proliferação da célula beta, dada a possibilidade da aplicação deste conhecimento na terapia celular da diabetes. Vários fatores de proliferação celular parecem regular o ciclo celular da célula beta tais como: as ciclinas e as proteínas quinases dependentes de ciclina; os fatores que agem através dos receptores de tirosina quinases (RTKs); os fatores que agem através da via JAK/STAT; os fatores que agem através de receptores acoplados à proteina G, etc. (Yesil & Lammert, 2008). Entretanto, em particular, a via de sinalização da Wnt/beta-catenina tem sido pouco investigada no pâncreas endócrino. Foi demonstrado que a beta-catenina participa não somente como um componente estrutural das junções de adesão, mas também é uma molécula sinalizadora juntamente com a Wnt, as quais são importantes em vários processos celulares, tais como diferenciação e proliferação (Jin, 2008; Murtaugh, 2008).

2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO DA WNT/BETA-CATENINA

As Whts fazem parte de uma família de proteínas sinalizadoras secretadas que desempenham suas funções através de mecanismos autócrinos e parácrinos. Essas proteínas interagem com um receptor, denominado Frizzled, e um co-receptor chamado LRP (lipoprotein receptor-related proteins) e desencadeiam uma reação em cascata resultando no acúmulo de beta-catenina no citoplasma. Este pool de beta-catenina é deslocado até o núcleo onde ocorre interação com fatores de transcrição, como o TCF/LEF1 (T Cell specific Fator/Lymphoid Enhancer-binding Factor); esse complexo protéico ativa a expressão de genes alvo como c-Myc e ciclina D, que, por sua vez, ativam o processo de proliferação e/ou diferenciação celular (Murtaugh, 2008; Welters & Kulkarni, 2008). Na ausência do estímulo da Wnt, o nível da beta-catenina citoplasmática é mantido baixo através da sua interação com a molécula caderina nos sítios de adesão intercelular da membrana plasmática ou por degradação no proteossoma desencadeada pela fosforilação da betacatenina pelo complexo formado por GSK3β/Axina/APC. A ativação da via de sinalização Wnt leva à inibição da GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) mediada pela proteína citoplasmática Dsh (Dishevelled Protein) e consequentemente à acumulação da betacatenina no citoplasma e núcleo (Murtaugh et al., 2008) (Figura 1).

Trabalhos recentes demonstraram que a via da Wnt/beta-catenina influencia múltiplos processos no desenvolvimento animal. Li *et al.* (2005) relataram que esta via de sinalização desempenha funções no desenvolvimento do cérebro, espinha dorsal e em diversas sub-populações de neurônios motores e sensoriais. Ainda, no sistema nervoso central, a Wnt/beta-catenina está relacionada com desenvolvimento de vasos sanguíneos do tecido neural (Daneman *et al.*, 2009). Outro órgão no qual a via Wnt tem sido investigada é o fígado; sabe-se que a mesma interfere em diversas funções como desenvolvimento, crescimento, regeneração e metabolismo deste órgão (Thompson & Monga, 2007).



Figura 1. Via de sinalização da Wnt/beta-catenina (explicação no texto; esquema adaptado do publicado por Murtaugh *et al.*, 2008).

O interesse pelo estudo da via da Wnt/beta-catenina no pâncreas tem surgido mais recentemente. Foi demonstrado que a inibição desta via parece ser essencial para a especificação do tecido pancreático durante o desenvolvimento do endoderma, enquanto que o crescimento e diferenciação do pâncreas exócrino no feto dependem da via estar ativa (Murtaugh, 2008). Entretanto, o papel da via da Wnt/beta-catenina no desenvolvimento e função das células endócrinas pancreáticas, incluindo a célula beta, permanece controverso. Dessimoz e colaboradores (2005) observaram, em camundongos *knockout* condicional para beta-catenina, uma pequena diminuição na massa da ilhota pancreática associada a um quadro de pancreatite. Murtaugh e colaboradores (2005), por sua vez, verificaram, utilizando um outro animal *knockout* para beta-catenina, uma redução dramática no tamanho do pâncreas, especificamente da sua porção exócrina. Por outro lado, um trabalho independente utilizando embriões de galinha relatou que a ativação da beta-catenina inibe a diferenciação do pâncreas endócrino por um comprometimento da expressão gênica da

neurogenina 3 (um dos marcadores da célula beta) (Pedersen *et al.*, 2005). Embora os dados referentes à importância da via Wnt/beta-catenina no desenvolvimento do pâncreas endócrino sejam ainda bastante inconsistentes, há evidências sugerindo um papel para esta via na proliferação e função das células beta pancreáticas no animal adulto. Camundongos *knockout* para o co-receptor da Wnt, o LRP, apresentam um comprometimento da homeostase glicêmica e da secreção de insulina estimulada por glicose (Fujino *et al.*, 2003). Rulifson e colaboradores (2007) demonstraram que a ativação pós-natal da beta-catenina nas células beta resulta em aumento da proliferação deste tipo celular enquanto que a expressão aumentada (induzida) da Axina 2 (uma antagonista da via da Wnt/beta-catenina) tem um efeito oposto. É importante ressaltar, entretanto, que esses estudos de "perda e ganho de função" (*loss-of-function; gain-of-function*), embora válidos para se investigar a importância de certa proteína ou via de sinalização, não comprovam definitivamente que tal via desempenha um papel em situações fisiopatológicas.

2.4 MODELO ANIMAL DA DIABETES TIPO 2

Existem vários modelos animais de diabetes envolvendo a administração de drogas, dietas especiais ou mesmo animais transgênicos. Nosso grupo de pesquisa, objetivando o estudo do papel das interações célula-célula mediadas pelas junções intercelulares na patogênese da diabetes tipo 2, tem empregado um modelo experimental de disfunção pancreática que utiliza camundongos C57BL/6, *wild-type e knockout* para o receptor da lipoproteina LDL, que desenvolvem um quadro de diabetes melito do tipo 2 como resultado da ingestão de ração com alto teor de lipídeos (De Souza *et al.*, 2005; Winzell and Ahrén 2004; Shafrir *et al.*, 1999; Surwit *et al.*, 1988). Dentre as várias linhagens de camundongos, a linhagem C57BL/6 parece ser a mais sensível à dieta, devido possivelmente a uma prédisposição genética (Surwit *et al.*, 1988). Existem evidências mostrando que os animais LDLr-/- possuem uma maior susceptibilidade metabólica à dieta, uma vez que são hipercolesterolêmicos e hipertrigliceridêmicos, e, portanto, o efeito lipotóxico sobre a célula beta poderia ser mais acentuado nesses animais (Poitout & Robertson, 2008; Drolet *et al.*, 2006; Schreyer *et al.*, 2002). O uso de ambos os animais, *wild-type e knockout* pode

fornecer, assim, um espectro de diferentes graus de respostas metabólicas e funcionais do pâncreas endócrino, o que nos parece interessante para o presente estudo.

Este modelo tem sido utilizado para estudar a patogênese da ateroesclerose associada à resistência periféria à insulina, à diabetes melito não dependente de insulina (tipo 2) e à obesidade (Drolet et al., 2006; Schreyer et al., 2002). Entretanto, a repercussão na função pancreática endócrina da ingestão de ração com alto teor de lipídios tem sido pouco investigada. Trabalhos descrevendo alterações funcionais e morfométricas do pâncreas endócrino neste modelo empregando camundongos C57BL/6 wild-type são escassos (Sone & Kagawa, 2005; Ahrén et al., 1997) e os dados concernentes aos aspectos histológicos (estrutura e citoarquitetura) e morfométricos (tais como, número, área/volume, massa relativa, etc.) das ilhotas pancreáticas são incompletos e inconsistentes. Sone & Kagawa (2004) demonstraram que camundongos machos alimentados com ração hiperlipídica apresentaram aumento da massa relativa de célula beta e da ilhota, associado com hiperinsulinemia e hiperglicemia após 4 meses com esta alimentação. Após estabelecimento da diabetes (caracterizada por hiperglicemia e resistência periférica à insulina não associada com uma hiperinsulinemia) com 12 meses de dieta, os animais apresentaram uma diminuição significativa da massa de célula beta. Ahrén et al. (1997), por sua vez, observaram nenhuma alteração significativa da morfologia geral e da área da ilhota de camundongos fêmeas submetidos à ração hiperlipídica por 3 meses. Tais discrepâncias podem ser resultantes de diferenças no sexo do animal, composição e tempo de alimentação com a ração. Até o momento, não encontramos na literatura trabalhos investigando a resposta morfométrica pancreática endócrina frente à dieta hiperlipídica em animais LDLr-/-.

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

A presente dissertação teve como objetivos gerais investigar: 1) se as alterações metabólicas induzidas pela exposição à dieta hiperlipídica, por um curto período de tempo,

são acompanhadas por alterações compensatórias do pâncreas endócrino, como disfunção secretora e hiperplasia da célula beta, nos animais *wild-type* (LDLr+/+) e *knockout* (LDLr-/-), que diferem quanto ao quadro metabólico de lipídios e carboidratos e 2) o possível envolvimento da via de sinalização da Wnt/beta-catenina no processo de proliferação compensatória da célula beta no modelo caracterizado.

Para tal, foram desenvolvidas as seguintes etapas: 1) avaliação metabólica deste modelo animal de diabetes tipo 2, analisando-se os parâmetros de peso do animal, glicemia (em jejum e pós-prandial), resposta ao Teste de Tolerância à Glicose Oral (GTT) e ao Teste de Tolerância à Insulina (ITT), 2) avaliação dos aspectos funcionais (concentração plasmática de insulina e secreção estática estimulada de insulina por ilhota), bem como dos aspectos histológicos e morfométricos (número estimado de ilhotas, massa total das ilhotas e das células beta, etc.) do pâncreas endócrino nestes animais, *wild-type e knockout* para o receptor da LDL, submetidos à dieta hiperlipídica; e 3) investigação da possível ativação da via da Wnt/beta-catenina no pâncreas endócrino nestes animais, analisando-se a expressão e localização celular de proteínas associadas a esta via (beta-catenina ativada ou não, ciclina D e c-Myc). Para estudar esses parâmetros nas fases iniciais do desenvolvimento da diabetes, neste modelo, camundongos da linhagem C57BL/6 foram alimentados com dieta hiperlipídica por um período curto de 60 dias.

Acreditamos que o desenvolvimento do projeto que originou esta dissertação trará contribuições na área da biologia do pâncreas endócrino, bem como no estudo dos mecanismos do diabetes tipo 2. Além disso, este trabalho visou investigar uma via de proliferação ainda pouco estudada nas ilhotas pancreáticas, sobre a qual há controvérsias a respeito de sua importância na proliferação das células beta (Murtaugh, 2008). Trabalhos como este poderão dar subsídio às investigações sobre terapia celular da diabetes melito.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann, A. M. and Gannon, M. (2007). Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* **38**, 193-206.

Ahrén, B., Simonsson, E., Scheurink, A. J., Mulder, H., Myrsén, U. and Sundler, F. (1997). Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. *Metabolism* **46**, 97-106.

Andralojc, K. M., Mercalli, A., Nowak, K. W., Albarello, L., Calcagno, R., Luzi, L., Bonifacio, E., Doglioni, C. and Piemonti, L. (2009). Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia* **52**, 486-93.

Bavamian, S., Klee, P., Britan, A., Populaire, C., Caille, D., Cancela, J., Charollais, A. and Meda, P. (2007). Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion. *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2, 118-32.

Bosco, D. Meda, P. (1997). Reconstructing islet function *in vitro*. *In:* Soria (Ed.), Physiology and Pathophysiology of the Islets of Langerhans, pp. 285-298. New York, U.S.A.: Plenum Press.

Calabrese, A., Zhang, M., Serre-Beinier, V., Caton, D., Mas, C., Satin, L. S. and Meda, P. (2003). Connexin 36 controls synchronization of Ca2+ oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetes* 52, 417-24.

Carvalho, C. P., Barbosa, H. C., Britan, A., Santos-Silva, J. C., Boschero, A. C., Meda, P. and Collares-Buzato, C. B. (2010). Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. *Diabetologia* 53, 1428-37.

Carvalho, C. P., Martins, J. C., da Cunha, D. A., Boschero, A. C. and Collares-Buzato, C. B. (2006). Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. *Ann Anat* 188, 221-34.

Cirulli, V., Halban, P. A. and Rouiller, D. G. (1993). Tumor necrosis factor-alpha modifies adhesion properties of rat islet B cells. *J Clin Invest* **91**, 1868-76.

Collares-Buzato, C.B. (2007). Junções Celulares. *In:* A Célula. Eds: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. Editora Manole, Barueri, pp. 92-112.

Collares-Buzato, C. B., Carvalho, C. P., Furtado, A. G. and Boschero, A. C. (2004). Upregulation of the expression of tight and adherens junction-associated proteins during maturation of neonatal pancreatic islets in vitro. *J Mol Histol* **35**, 811-22.

Collares-Buzato, C. B., Leite, A. R. and Boschero, A. C. (2001). Modulation of gap and adherens junctional proteins in cultured neonatal pancreatic islets. *Pancreas* 23, 177-85.

Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J. and Barres, B. A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 641-6.

De Souza, C. T., Araújo, E. P., Prada, P. O., Saad, M. J., Boschero, A. C. and Velloso, L. A. (2005). Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* **48**, 1860-71.

Dessimoz, J., Bonnard, C., Huelsken, J. and Grapin-Botton, A. (2005). Pancreasspecific deletion of beta-catenin reveals Wnt-dependent and Wnt-independent functions during development. *Curr Biol* **15**, 1677-83.

Drolet, M. C., Roussel, E., Deshaies, Y., Couet, J. and Arsenault, M. (2006). A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* 47, 850-5.

Ekblad, E. and Sundler, F. (2002). Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides* **23**, 251-61.

Fujino, T., Asaba, H., Kang, M. J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D. H., Ioka, R. X., Ono, M., Tomoyori, H. et al. (2003). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 229-34.

Guyton, A. C. (2006). Textbook of medical physiology. Elsevier Saunders, pp. 960-970.

Halban, P. A., Wollheim, C. B., Blondel, B., Meda, P., Niesor, E. N. and Mintz, D. H. (1982). The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. *Endocrinology* **111**, 86-94.

Hong, E. G., Noh, H. L., Lee, S. K., Chung, Y. S., Lee, K. W. and Kim, H. M. (2002). Insulin and glucagon secretions, and morphological change of pancreatic islets in OLETF rats, a model of type 2 diabetes mellitus. *J Korean Med Sci* **17**, 34-40.

Janssen, S. W., Hermus, A. R., Lange, W. P., Knijnenburg, Q., van der Laak, J. A., Sweep, C. G., Martens, G. J. and Verhofstad, A. A. (2001). Progressive histopathological changes in pancreatic islets of Zucker Diabetic Fatty rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109, 273-82.

Jin, T. (2008). The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* **51**, 1771-80.

Kanno, T., Gopel, S. O., Rorsman, P. and Wakui, M. (2002). Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet. *Neurosci Res* **42**, 79-90.

Komatsu, M., Sato, Y., Aizawa, T. and Hashizume, K. (2001). KATP channelindependent glucose action: an elusive pathway in stimulus-secretion coupling of pancreatic beta-cell. *Endocr J* 48, 275-88.

Leite, A. R., Carvalho, C. P., Furtado, A. G., Barbosa, H. C., Boschero, A. C. and Collares-Buzato, C. B. (2005). Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 142-51.

Li, F., Chong, Z. Z. and Maiese, K. (2005). Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res* **2**, 331-40.

Liew, C. G. and Andrews, P. W. (2008). Stem cell therapy to treat diabetes mellitus. *Rev Diabet Stud* 5, 203-19.

Martins, J.R., Carvalho, C.P., Leonardo, M.B., Boschero, A.C., Collares-Buzato, C.B. (2006). Immunolocation of junctional proteins during in vivo maturation of the endocrine pancreas. *In:* Proceedings of the IV International Symposium on Extracellular Matrix (SBBC-SIMEC). p. 42-42.

Meda, P., Chanson, M., Pepper, M., Giordano, E., Bosco, D., Traub, O., Willecke, K., el Aoumari, A., Gros, D. and Beyer, E. C. (1991). In vivo modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic B-cells. *Exp Cell Res* **192**, 469-80.

Meda, P., Perrelet, A. and Orci, L. (1979). Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. *J Cell Biol* **82**, 441-48.

Murtaugh, L. C. (2008). The what, where, when and how of Wnt/beta-catenin signaling in pancreas development. *Organogenesis* **4**, 81-86.

Murtaugh, L. C., Law, A. C., Dor, Y. and Melton, D. A. (2005). Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development. *Development* 132, 4663-74.

Orci, L. (1976). The microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism* 25, 1303-13.

Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Amherdt, M., Ravazzola, M., Weisswange, A., Dobbs, R., Perrelet, A. and Unger, R. (1975). Cell contacts in human islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* **41**, 841-4.

Pedersen, A. H. and Heller, R. S. (2005). A possible role for the canonical Wnt pathway in endocrine cell development in chicks. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 961-8.

Pipeleers, D., in't Veld, P. I., Maes, E. and Van De Winkel, M. (1982). Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7322-5.

Pipeleers, D., Kiekens, R., Ling, Z., Wilikens, A. and Schuit, F. (1994). Physiologic relevance of heterogeneity in the pancreatic beta-cell population. *Diabetologia* **37 Suppl 2**, S57-64.

Poitout, V. and Robertson, R. P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29, 351-66.

Ravier, M. A., Güldenagel, M., Charollais, A., Gjinovci, A., Caille, D., Söhl, G., Wollheim, C. B., Willecke, K., Henquin, J. C. and Meda, P. (2005). Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca2+ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* 54, 1798-807.

Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M. M., Nusse, R., Hebrok, M. and Kim, S. K. (2007). Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6247-52.

Schreyer, S. A., Vick, C., Lystig, T. C., Mystkowski, P. and LeBoeuf, R. C. (2002). LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E207-14.

Serre-Beinier, V., Le Gurun, S., Belluardo, N., Trovato-Salinaro, A., Charollais, A., Haefliger, J. A., Condorelli, D. F. and Meda, P. (2000). Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes* **49**, 727-34.

Shafrir, E., Ziv, E. and Mosthaf, L. (1999). Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. *Ann N Y Acad Sci* 892, 223-46.

Sone, H. and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 48, 58-67.

Sorenson, R. L., Brelje, T. C., Hegre, O. D., Marshall, S., Anaya, P. and Sheridan, J. D. (1987). Prolactin (in vitro) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islet B cells. *Endocrinology* **121**, 1447-53.

Straub, S. G. and Sharp, G. W. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 451-63.

Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A. and Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* **37**, 1163-7.

Thompson, M. D. and Monga, S. P. (2007). WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* **45**, 1298-305.

Vozzi, C., Ullrich, S., Charollais, A., Philippe, J., Orci, L. and Meda, P. (1995). Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol* **131**, 1561-72.

Wellershaus, K., Degen, J., Deuchars, J., Theis, M., Charollais, A., Caille, D., Gauthier, B., Janssen-Bienhold, U., Sonntag, S., Herrera, P. et al. (2008). A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells. *Exp Cell Res* **314**, 997-1012.

Welters, H. J. and Kulkarni, R. N. (2008). Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 349-55.

Winzell, M. S. and Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S215-9.

Wong, H. Y., Ahrén, B., Lips, C. J., Höppener, J. W. and Sundler, F. (2003). Postnatally disturbed pancreatic islet cell distribution in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. *Regul Pept* **113**, 89-94.

Yesil, P. and Lammert, E. (2008). Islet dynamics: a glimpse at beta cell proliferation. *Histol Histopathol* **23**, 883-95.

DECREASED CX36 ISLET CONTENT AND IMPAIRED COMPENSATORY BETA CELL FUNCTION AND GROWTH IN RESPONSE TO HIGH FAT DIET IN LDL RECEPTOR KNOCKOUT MICE.

ABSTRACT

Insulin secretion is a complex process that depends on several extra- and intracellular events, including the gap junction-mediated intercellular communication (GJIC). The reasons for beta cell dysfunction in type 2 diabetes mellitus (T2DM) are not completely understood. Mice deficient of the lipoprotein LDL receptor (LDLr-/-) have been used as a model of primary hypercholesterolaemia, a risk factor of type 2 diabetes. This work investigates the gap junctional connexin 36 (Cx36) islet content and the functional and growth response of pancreatic beta cells to a high fat diet (HF) for 60 days in wild-type (WT, LDLr+/+) and lipoprotein LDL receptor knockout (LDLr-/-) C57BL/6 adult mice. After HF diet, WT animals became obese and hypercholesterolaemic as well as moderate hyperglycemic, hyperinsulinemic, glucose intolerant and insulin resistant characterizing them as pre-diabetic. In addition, HF diet-fed mice displayed a significant decrease in secretory response of beta cells to glucose. Overall, LDLr-/- mice displayed a relatively high susceptibility to the diet as judged by their marked hypercholesterolemia and intolerance to glucose, and highly decreased glucose-stimulated insulin secretion per islet. Nevertheless, HF diet induced similarly in WT and LDLr-/- mice a significant decrease in Cx36 beta cell content as revealed by immunohistochemistry and Western Blot. Both WT and LDLr-/groups fed a HF diet showed an increase in proliferation of beta cells as assessed by Ki67 immunolabelling, but only WT displayed morphometric changes indicative of hyperplasia of the endocrine pancreas such as an increase of the total islet and beta cell masses. Concluding, the prediabetic state in both WT and LDLr-/- is associated with a decreased Cx36 expression that suggests a possible role of the GJIC in the pathogenesis of T2DM. The higher metabolic susceptibility to HF diet seen in LDLr-/- mice, as compared to WT, may be explained by a deficiency in insulin secretory response to glucose and the absence of compensatory hyperplasia of the endocrine pancreas.

1 INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is one of the most prevalent metabolic disease affecting hundreds million people worldwide. T2DM has often an adulthood onset and is characterized initially by a moderate fasting hyperglycemia associated with marked peripheral insulin resistance state partially compensated by beta cell hyperplasia (Tripathy & Chaves, 2010; Prentki & Nolan, 2006; Rhodes, 2005). In later stages, decrease in beta cell function and mass leads to dependence on insulin reposition in T2DM (Tripathy & Chaves, 2010; Prentki & Nolan, 2006; Rhodes, 2005). Insulin secretion is a complex process that depends on several extra- and intracellular events, including ATP-dependent K^+ channel-mediated membrane depolarization, voltage-dependent Ca²⁺ channel opening resulting in Ca²⁺ entry and intracellular increase of this cation and gap junction (GJ)mediated intercellular Ca²⁺ oscillation synchronization (Suckale & Solimena, 2008; Serre-Beinier et al., 2002). The reasons for beta cell dysfunction in T2DM are not completely understood. Nevertheless, it has been demonstrated that diabetic animals display impairment of several steps involved in the stimuli-secretion coupling process probably caused by chronic exposure to hyperglycemia and/or hyperlipidemia, respectively referred to as glycotoxicity and lipotoxicity (Del Prato, 2009; Poitout & Robertson, 2008; Prentki & Nolan, 2006).

Obesity and dyslipidemia are well-known positive risk factors for the development of T2DM (Ding *et al.*, 2010; Prentki & Nolan, 2006). Recent data suggest that intracellular cholesterol and free fatty acid levels may influence beta cell function and survival (Peyot *et al.*, 2010; Del Prato, 2009; Allagnat *et al.*, 2008; Rhodes, 2005). *In vitro* exposure of beta cell line to lipids leads to reduced gap junctional Cx36 islet expression and concomitantly to an elevated basal insulin secretion and blunted response to glucose, both defects known to follow diabetic state *in vivo* (Allagnat *et al.*, 2008). We have recently demonstrated that high fat diet-fed wild type mice, that became obese and pre-diabetic, displayed a decrease in beta cell secretory response and concomitantly a reduced gap junctional Cx36 islet content associated with decreased GJ plaque size and impairment of gap junctional beta cell-beta cell coupling (Carvalho, 2009).

Transgenic animals have been designed for investigating the influence of dyslipidemia on cardiovascular abnormalities and metabolic disturbances (Eto et al., 2002; Fan & Watanabe, 2000). Low density lipoprotein receptor (LDLr) knockout (LDLr-/-) mice have been used extensively as a research model to study pathways involved in LDLmediated lipid metabolism and as an animal model of atherosclerosis and familial hypercholesterolemia (Coenen & Hasty, 2007; Merat et al., 1999; Palinski et al., 1995). Nevertheless, the effect of deficiency of LDLr on carbohydrate metabolism and especially on beta cell function has been less explored and has yielded conflicting data (Karagiannides et al., 2008; Schreyer et al., 2002). The LDLr removes cholesterol-rich intermediate density lipoproteins (IDL) and LDL from the plasma compartment, thereby regulating plasma cholesterol levels (Brown & Goldstein, 1986). Therefore, LDLr-deficient mice display hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia that are aggravated following fat-enriched diets (Coenen & Hasty, 2007; Schreyer et al., 2002; Palinski et al., 1995). In this work, we investigated the effect of low-fat (LF) and high-fat (HF) diets on Cx36 islet content and beta cell secretory function and growth in wild-type (WT; LDLr+/+) and LDLr-/- C57BL/6 mice. By employing these different mice and diets, we expected to obtain animals that display different degrees of hypercholesterolemia and metabolic responses to diets, yielding a suitable model to investigate the influence of dyslipidemia and associated metabolic disturbances on beta cell communication, function and growth.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMALS AND DIETS

Male and female C57BL/6 wild type and LDLr-deficient mice were obtained from the breeding colony of the University of Campinas (UNICAMP, Campinas, Brazil) and housed at 25°C on a 12h light/dark cycle. Mice, aged 16th to 20th weeks, had access to a standard chow diet (LF) (Nuvital CR1, Colombo, Paraná, Brazil) (composition: 4.5 g% lipid, 53 g% carbohydrate and 23 g% protein) or to a high fat diet (HF, composition: 21 g% lipid, 50 g% carbohydrate and 20 g% protein) and water *ad libitum* during 8 weeks (60 days). All experiments were performed in female and male mice since no significant differences between sexes were observed regarding the metabolic parameters analysed after 60d on this diet (*i.e.* cholesterolemia, fast and fed glycemia and insulinemia) (data not shown). Therefore, the data presented here are from pooled results of groups containing comparable numbers of each gender. The animals were used in accordance with the guidelines of the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation of the UNICAMP.

2.2 PLASMA BIOCHEMICAL ANALYSIS

Animals were fasted for 12h or had free access to food (fed) before blood sampling, which was carried out between 9:00 and 11:00 am. Blood samples were collected from either the neck vessels (after decapitation) or the tail tip. Total cholesterol was measured in fresh plasma in the fasting state using a standard commercial kit, according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannhein, Germany). Glucose levels (fast and fed) were measured using a glucose analyzer (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Switzerland) and plasma insulin (fast) was measured by radioimmunoassay (RIA) using rat insulin standard.

2.3 TEST OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE (GTT) AND INSULIN TOLERANCE (ITT)

At the end of diet period, mice were submitted to GTT or ITT. For the GTT, mice were fasted for 12h and a blood sample was taken from the tale tip to determine the initial glycemia (t=0). A glucose load (1.5 g/kg body weight) was then administered by oral gavage and additional blood samples were collected and glycemia measured at different time points (15, 30, 60 and 90 min). The ITT was performed in a separated fed mice group which had its initial blood glucose (t=0) measured just before the injection of insulin (0.5 U/kg body weight of human insulin - Biohulin®R, Biobrás – Brazil). Blood samples were collected at 10, 15, 30 and 60 min after insulin injection to determine the glucose levels. For both tests, the glucose levels were measured using an Accu-Check Advantage (Roche Diagnostic, Switzerland). The results of GTT is presented as absolute glycemia values and

AUC (Area Under Curve) and ITT data, as percentage to the initial glycemia values (t=0) and AUC.

2.4 ISLET ISOLATION

Islets were isolated by injection of 3mL type V collagenase solution (1.7mg/mL in Hank's balanced salt solution pH 7.4) (EC 3.4.24.3, Sigma, St Louis, MO – USA) within the pancreas, followed by incubation at 37°C for 24 min then washes in Hank's to remove collagenase. After separation with Histopaque 1077 (Sigma), pancreatic islets were individually collected under a dissecting microscope. Fresh islets were used for determining glucose-stimulated insulin secretion or homogenized in an anti-protease cocktail for immunoblotting.

2.5 INSULIN SECRETION

For determining glucose-stimulated insulin secretion, five fresh islets were added to each microtube (20-30 microtubes/group) and preincubated for 30 min at 37°C in 0.5 mL bicarbonate-buffered Krebs solution (BBKS; composition in mM: NaCl 112, KCl 5, MgCl 1, CaCl 25, NaHCO₃ 1, HEPES 15) containing 5.6 mM glucose and 3mg/mL bovine serum albumin and equilibrated to pH 7.4 with a mixture of 95% O₂ - 5% CO₂. The islets were then incubated for 1 h at 37°C in 0.5 mL BBKS supplemented with either 2.8 or 16.7 mM glucose. Aliquots of the supernatant fraction were taken and stored at -20° C. The insulin content within the samples was determined by RIA and expressed as ng per islet/h (Carvalho *et al.*, 2010).

2.6 WESTERN BLOT

Pools of islets from all the experimental groups were homogenized in an antiprotease cocktail for immunoblotting (Leite *et al.*, 2005). The protein content was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA – USA). The protein concentration of different samples was set as $50\mu g/\mu L$ and incubated for 1h at $37^{\circ}C$ with 5X concentrated Laemmli sample buffer (30% of volume). The protein samples were then

separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and transfered to nitrocellulose membrane (Bio-Rad), and staining with Ponceau S solution (Sigma) to compare corresponding bands. Membranes were blocked overnight at 4 °C with TTBS (0.05 mol/L Tris-buffered saline, TBS, pH 7.4, containing Tween 20 0.05% [vol/vol]) plus 5% dry skimmed milk (wt/vol). During 2 h at room temperature (RT), membranes were incubated with the primary antibody (anti-Cx36; Zymed, South San Francisco, CA – USA) diluted (1:350) with 3% dry skimmed milk in TTBS. Then, the specific secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Zymed; dilution 1:2500) was incubated for 1h in TTBS plus 1% dry skimmed milk. Subsequently, membranes were washed and the detection of antibodies was performed using an enhanced chemiluminescence kit (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL - USA) and autoradiography film (Amersham, Cleveland, OH - USA). Band intensities were quantified by optical densitometry using the Image J analysis software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). After stripping, the membranes used for Cx36 detection were reblotted with an anti-Beta-actin, antibody as a loading control and the values were expressed as a ratio of Cx36/Beta-actin signals. The specificity of antibodies was confirmed in brain homogenates used as positive controls as previously described (Carvalho et al., 2010).

2.7 CO-LOCALIZATION OF CX36 AND INSULIN

Pancreas were frozen in n-hexane with liquid nitrogen and sectioned in a cryostat. Sections (8 μ m thick) were fixed with acetone at -20°C for 3 min and stored at -20°C until the immunofluorescence staining. All sections were incubated for 1 h with 5% dry skimmed milk solution (wt/vol. in TBS), then with the primary antibody (rabbit anti-Cx36; Zymed; dilution 1:30 in TBS plus 3% dry skimmed milk) for 2h at room temperature (RT), followed by a 2h-incubation at RT with the specific FITC-labelled secondary antibody (Sigma; dilution 1:300 in TBS plus 1% dry skimmed milk). After, the sections were incubated for 1h and 30min with guinea pig anti-insulin antibody (Dako, Glostrup -Denmark; dilution 1:100) and then with the specific TRITC-conjugated secondary antibody (Sigma; dilution 1:150). Finally, sections were mounted with Vectashield Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed using a confocal laser-scanning microscope (LSM 510 META; Zeiss, Hamburg, Germany). To allow comparison among all animal groups studied, islet sections were processed and analyzed by immunofluorescence during the same session using identical confocal parameters. For negative control, sections were incubated with 3% dry skimmed milk only (wt/vol in TBS); the primary antibody omission did not result in a consistent labelling of islet cells.

2.8 HISTOLOGICAL PROCESSING

Pancreas from all experimental groups were removed, weighed and fixed for 18h in either Bouin solution, in case of insulin labelling, or in 4% paraformaldehyde (in TBS) for Ki67 and TUNEL reaction. Each pancreas was sectioned in 3 to 5 fragments and each piece embedded separately in paraffin. Two to three blocks from each pancreas were serially sectioned (5 µm thick slice). One to two sections per block (given two to six sections analyzed per pancreas) were randomly selected and processed for either insulin, Ki67 immunoperoxidase reaction or TUNEL assay.

2.9 IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR INSULIN AND K167

After paraffin removal, the sections were rehydrated and, in the case of Ki67 labeling, treated with Sodium Citrate buffer (0.01M, pH 7.6) for 60 min in a steam cooker to retrieve the Ki67 antigenicity. After washing with TBS, endogenous peroxidase was blocked using hydrogen peroxide (0.3% H₂O₂ in methanol [vol/vol]) for 30 min followed by incubation with 5% dry skimmed milk in TBS (wt/vol) for 1h. The sections were, then, incubated with guinea pig anti-insulin (Dako, dilution 1:50) or rat anti-Ki67 (TEC3; Dako, dilution 1:20) overnight at 4°C. For insulin reaction, sections were incubated with the secondary antibody, anti-guinea pig IgG conjugated with HRP (Zymed, dilution 1:1500), for 1h and 30min. For Ki67 detection, 45 min incubation with a biotinylated anti-rat IgG (Dako, dilution 1:75) was performed followed by 30 min-incubation with streptavidin-HRP (Invitrogen, Carlsbad, CA – USA, dilution: 1:200), both at RT. Then, sections were treated with 10% 3,3'diaminobenzidine (DAB, in Tris HCl buffer 0.1M, pH 7.4 [wt/vol]) (Sigma) and 0.2% H₂O₂ in TBS (vol/vol). Finally, the sections were quickly stained with Ehrlich's

Hematoxylin and mounted for microscopy observation. The **rate of beta cell proliferation** was determined by counting the number of Ki67-positive cell nuclei within the islet core (x100) and dividing it by the total number of islet nuclei. As indexes of beta cell neogenesis, we determined the frequency of association between islet and duct as well as the presence of insulin-positive cells within the duct epithelium and clusters of beta cells (containing less than 5 cells) budding from or nearby the ducts (Montanya & Téllez, 2009). All insulin-positive ductal cells were counted and divided by the area of the corresponding pancreas section. Beta cell neogenesis was expressed as insulin⁺ cells/ μ m².

2.10 TUNEL ASSAY

To prepare specimen for TUNEL staining, paraffin pancreas sections were dewaxed and equilibrated in TBS, followed by incubation with Proteinase K solution (Sigma, 20µg/mL in 0.01M Tris-HCl pH 7.4) for 20 min at RT. After washing, sections were treated with 0.01% Triton X-100 and 0.1% Sodium Citrate solution in distilled water for 5 min. Following washing, the reaction mixture, containing terminal deoxynucleotidyltransferase (TDT), labeled nucleotides, and DNA polymerase, was then applied to sections in a humidified chamber for 60 min at 37°C, according to the manufacturer's instructions (Kit In Situ Cell Death Detection, KIT POD, Roche). After washing, anti-fluorescein antibody peroxidase conjugate was added to the sections for 30 min at 37°C. Sections were washed, incubated with DAB substrate as described above, and after stained with Ehrlich's Hematoxylin, they were visualized by light microscopy. Positive control sections were treated with DNAse enzyme (3U/mL in 0.05M Tris-HCl pH 7.4, 0.01M MgCl₂ and 1mg/mL albumin) for 15 minutes at RT previously the TUNEL reaction. The negative control sections were exposed to enzyme TDT only, instead of the whole TUNEL mixture.

2.11 MORPHOMETRY

The pancreas morfometry was performed mostly in immunolabelled insulin sections, as previously described with some modifications (Inuwa & Mardi, 2005, Sone & Kagawa, 2005). Briefly, all islets (with at least 5 cells or more) of the pancreas sections selected (n=6 sections/animal, n=8-11 animals/group, given n=450-800 islets/group) were
photographed with a digital camera (Nikon FDX-35) coupled to a light microscope (Nikon Elipse E800) and images were captured by an image analysis system (Image Pro Plus for Windows). All the stereological measurements were done in these digitalized images using the free software ImageTool (<u>http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html</u>). The **beta cell relative area** was determined by dividing the total area of insulin positive cells by the islet area multiplied by 100. The **islet relative area** was calculated by dividing the sum of total islet area by the pancreas sectional area multiplied by 100. The estimated **total islet mass** (mg) was calculated by multiplying the pancreas weight by the mean of islet relative area. The estimated total **beta cell mass** (mg) was calculated by multiplying the total islet mass by the mean of percentage of beta cells within islet. The mean of number of islets per pancreas section was also determined.

2.12 STATISTICAL ANALYSES

All numerical results were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism Version 4.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). For comparing a pair of experimental groups, the statistical significance was assessed by t-Student test. For multiple comparisons, the statistical significance was assessed by ANOVA followed by the Bonferroni test. The significance level was set at p<0.05.

3 RESULTS

3.1 HIGH FAT DIET AND DEFICIENCY OF LDLR RESULT IN Hypercholesterolemia And Disturbances Of Glucose Homeostasis

The measurement of plasma cholesterol showed that LDLr-/- animals, when fed a low fat diet (LF), already display hypercholesterolemia that is markedly aggravated after high fat diet (HF) ingestion for 60d (Figure 1a). Increase of plasma cholesterol level was also observed in WT mice after HF diet (Figure 1a), the experimental groups can be placed

in an ascending order of cholesterolemia as follows: HF LDLr-/- >> LF LDLr-/- > HF WT> LF WT.

In addition to the changes in cholesterol levels, HF diet induced, in both WT and LDLr-/- mice, a significant increase in weight gain (p<0.0005) (Figure 1b) as well as an enhancement in fasting and post-prandial blood glucose levels (p<0.0005) (Figure 1c and d) as compared to animals treated on LF diet for the same period (control group). In the fed state, glucose level was slightly, but significantly, higher in LDLr-/- than in WT mice (169.1 \pm 8 (14) x 190.7 \pm 6 (19) mg/dL, WT x LDLR-/- respectively, p<0.05; Figure 1d) after HF diet. Regarding the fasted plasma insulin concentration (Figure 1e), the WT group fed a high fat diet showed a 5-fold increase (p=0.0002) in this parameter while the group LDLr-/- diet had an increase of 2.2 fold (p<0.05) in relation to their respective control mice. Therefore, treatment with high fat diet resulted in a relatively lower hyperinsulinemia in LDLr-/- in comparison with WT mice.

In order to further investigate the metabolic disorder presented by these animals, we performed glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests. As shown in Figure 2, the increase in blood glucose concentration after an oral glucose load was markedly enhanced, at all time points analyzed, in HF-fed mice as compared to LF-fed ones (Figure 2a). The incremental area under curve of the GTT was significantly greater in the HF-fed mice as compared to those fed a low fat diet (LF) (p<0.02) (Figure 2b). These results indicate that HF diet induces glucose intolerance in both WT and LDLr-/- animals. In accordance with previous report (Bonfleur *et al.* 2010), LDLr-/- mice fed a LF diet already display a glucose intolerance, that was comparable to the HF-fed WT group (Figure 2 a,b). In addition, the area under the curve of the GTT in HF-fed LDLr-/- mice was significantly greater than that of HF-fed WT mice (p<0.01), suggesting a higher metabolic susceptibility after HF of LDLr-/- mice in comparison with WT mice.

The ITT analysis showed that the glucose intolerance seen in WT group fed HF diet was associated with peripheral insulin resistance (Figure 2c, d). In contrast, administration of HF diet for 60d to LDLr-/- mice induced only a tendency of insulin resistance in this

experimental group (Figure 2c, d). Accordingly, i.p injection of insulin load for the ITT protocol resulted in similar plasma removal rates of glucose in both WT and LDLr-/- mice when fed LF diet. These findings show that LDLr-/- animals are not significantly insulin resistant even when challenged with a diet rich in lipids.

3.2 HIGH FAT DIET AND LDLR-/- DEFICIENCY INDUCE REDUCED GLUCOSE-Stimulated Insulin Secretion By Isolated Pancreatic Islets

Since the HF diet-induced hyperglycemia and glucose intolerance was not followed by significant insulin resistance in the case of LDLr-/- mice, we investigated the possibility that the pancreatic islet insulin secretory ability was reduced in these animals. As shown in Figure 3, islets from LDLr-/- as well as WT mice fed a HF diet displayed a significant reduction in insulin secretory response to glucose (Figure 3b, d) that was much more pronounced in LDLr-/- islets. Islets from WT animals fed a HF diet showed an unaltered 16.7 mM glucose-stimulated insulin secretion yet a significant higher basal secretion (2.8 mM glucose) (p<0.005) in comparison with islets isolated from LF-fed WT animals (Figure 3a). Meanwhile, islets from HF-fed LDLr-/- mice displayed a normal basal secretion (2.8mM glucose) but a significant decrease in stimulated insulin secretion (to 16 mM glucose) as compared to its control (LF-fed LDLr-/- mice) (p<0.013). In addition, comparing WT and LDLr-/- islets at low-fat condition, LDLr-/- islets secreted less insulin at the same supralimiar concentration of glucose (16.7 mM) $(1.349 \pm 0.1711 \text{ ng/islet.h})$ than the WT islets $(5.391 \pm 0.4801 \text{ ng/islet.h})$ (p<0.0001). These results suggest that the islets from LDLr-/- mice are less sensitive to glucose than islets from WT animals which can explain the relatively lower insulinemia and higher glucose intolerance in these mice after HF diet.

3.3 DECREASED INSULIN SECRETION INDUCED BY HF-DIET WAS ASSOCIATED WITH A REDUCTION IN GAP JUNCTIONAL Cx36 ISLET CONTENT IN BOTH LDLR-/- AND WT ISLETS.

In order to investigate the role of the Cx36-made GJ channels in the markedly reduced insulin secretory response to glucose of LDLr-/- islets, we analyzed the Cx36 islet content and distribution by Western Blot and immunofluorescence. As shown in the Figure 4, Cx36 immunolabelling was detected exclusively in insulin-secreting beta cells within the islets. No differences in Cx36 cell distribution was observed in pancreas cryosections from WT and LDLr-/- mice fed a HF diet in comparison with those that received LF diet (Figure 4a, b, c and d). Nevertheless, 60d exposure to HF diet induced a significant reduction in Cx36 islet content in WT mice and a tendency of reduction in LDLr-/- mice (p<0.03; one-tailed t Student test) (Figure 4i and k).

3.4 LACK OF COMPENSATORY HYPERPLASIA OF THE ENDOCRINE PANCREAS IN PREDIABETIC LDLR-/- MICE.

Regarding the histology of the pancreatic islet, no marked differences were observed among WT and LDLr-/- control or treated groups (Figure 5). Morphologically, pancreatic islets from all experimental groups exhibited a normal structure, characterized by a shape ranging from round to oval, surrounded by a very thin capsule of reticular fibers that separates it from the exocrine pancreatic parenchyma. The islet parenchyma consists of cords of endocrine cells interspersed by fenestrated capillaries. The islets, regardless the experimental group, showed a typical cytoarchitecture characterized by a core of beta cells surrounded by a mantle of non-beta cells (Figure 5a, b, c and d).

Nevertheless, the HF diet for 60d induced significant morphometric changes in the endocrine pancreas of WT mice (Figure 5a and b). The treated group showed a significant increase in islet mass (p=0.0006) (Figure 5f), beta-cell mass (p=0.0002) (Figure 5g) and in the number of islets per transversal pancreas section (p<0.01) (Figure 5h) when compared to low fat-fed mice. These results suggest that the endocrine pancreas of the HF-fed WT undergoes hyperplasia that is probably compensatory to the increasing demand for insulin

induced by the diet in these animals (Ahrén *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2010; Peyot *et al.*, 2010).

In contrast to WT, LDLr-/- mice showed no significant changes in these morphometric parameters when fed a HF diet (Figure 5c and d). No increase in islet or beta cell mass was observed in these mice after HF diet (Figure 5 f-h). Meanwhile, HF-fed LDLr-/- mice displayed a significant reduction in pancreas weight when compared to their LF-fed control group (Figure 5 e).

To investigate whether the lack of endocrine pancreas hyperplasia observed in the LDLr-/- was due in part to reduced beta cell proliferation, we performed immunolabeling of Ki67 protein, which is a suitable marker for cell proliferation in endocrine pancreas (Gianani, 2011; Sone and Kagawa 2005). Figure 6 shows that when submitted to HF diet ingestion, WT and LDLr-/- islets display a higher rate of beta-cell proliferation (Ki67 positive cells) in comparison with their respective control group (LF fed mice). In order to investigate the neogenesis degree in the endocrine pancreas of these animals, we determine the frequency of association between islet and duct as well as the presence of insulinpositive cells within the duct epithelium and small clusters of beta cells budding from or nearby the ducts. As shown in Figure 7, no significant differences were observed between the LF-fed and HF-fed WT mice regarding these two parameters (islet-duct association and frequency of insulin positive ductal cells), taken as indicative of neogenesis (Figure 7 b,d). Meanwhile, the frequency of islet-duct association was significantly reduced in HF-fed LDLr-/- mice as compared to those fed a LF diet. Additionally, we observed an overall low frequency of islet positive ductal in pancreas of LDLr-/- mice, that was of an order of 100-1000 fold lower than that observed in WT mice, that was not altered after HF diet (Figure 7 d).

Since hyperlipidemia is often associated with increased cell death within the islet due to lipotoxicity (Del Prato, 2009), we performed the TUNEL assay to determine the apoptosis index in the endocrine pancreas from all experimental groups. As shown in the Figure 8, no detectable reaction, as obtained by TUNEL, was observed in any of the pancreas sections analyzed from WT and LDLr-/- mice.

4 DISCUSSION

The pathogenesis of T2DM is complex but it ultimately depends on the pancreatic beta cell functional state. Hyperlipidemia has been pointed out as one of the important predisposition factors leading to the glucose homeostasis disturbances of T2DM (Ding *et al.*, 2010). Bonfleur and colleagues (2010) have demonstrated that a moderate hypercholesterolemia impairs the beta cell insulin secretion, leading to glucose intolerance without affecting peripheral insulin sensitivity in LDLr-/- mice fed a low-fat diet. We have recently suggested that impairment in gap junction-mediated intercellular communication (GJIC) may be involved in the development of pre-diabetes in WT C57BL/6 mice fed a HF diet (Carvalho 2009). The present study is an extension of these two previous works that addresses whether severe hyperlipidemia associated with a pre-diabetes affects beta cell communication, function and growth. For that, we have used wild-type (WT; LDLr+/+) and LDLr-/- C57BL/6 mice fed a low or high-fat diet to yield a range of different degrees of hypercholesterolemia.

As predicted, our experimental animals displayed marked differences in the plasma level of cholesterol being the lowest cholesterolemia value observed in the low fat diet-fed WT mice and the highest, in the high fat diet-fed LDLr-/- mice. The experimental groups can be placed in an ascending order of cholesterolemia as follows: HF LDLr-/- >> LF LDLr-/- >> HF WT> LF WT. These results are in accordance with other works showing that high fat diets and LDLr gene mutation *per se* induce marked increase in plasma cholesterol levels in mice (Bonfleur *et al.*, 2010; Coenen & Hasty 2007; Winzell & Ahrén 2004; Merat *et al.* 1999).

Associated with the hypercholesterolemia, the exposure to HF diet for only 60 days (8 weeks) induced in C57BL/6 mice (WT and LDLr-/-) a moderate hyperglycemia,

hyperinsulinemia, resistance to insulin and marked intolerance to glucose. These metabolic disturbances characterize the well-known pre-diabetic state that corresponds to the initial phase of the T2DM (Ding *et al.*, 2010; Tripathy & Chavez, 2010; Rhodes, 2005). The deleterious effect of HF diets on glucose homeostasis has been demonstrated in several models employing different animal species, diet formula and period of diet exposure (Collins *et al.*, 2010; Prentki & Nolan, 2006; Winzell & Ahrén, 2004; Merat *et al.*, 1999). Previous works have shown that C57BL/6 mice, in comparison with other mice strains, display larger glycemic responses to diet challenge and stress suggesting that this strain may carry a genetic predisposition to develop T2DM (Winzell & Ahrén 2004; Surwitt *et al.*, 1988). The fact we have observed here that a short time exposure (60d) to HF diet was enough to induce a pre-diabetic state in C57BL/6 mice confirms this hypothesis.

Under the experimental conditions tested here, LDLr-deficient mice displayed a relatively high susceptibility to the diet as judged by their marked hypercholesterolemia, postprandial hyperglycemia and intolerance to glucose. Several works have shown that LDLr-/- mice do respond metabolically to HF diets (Bie *et al.*, 2010; Schreyer *et al.*, 2002; Merat et al., 1999). In accordance with our data, Schreyer and colleagues (2002) suggested that LDLr-/- male mice (6 weeks old) fed a diabetogenic diet (35.5% fat content, mainly lard) up to 16 weeks were more susceptible to diet-induced obesity and hyperglycemia than WT C57BL/6 animals. Nevertheless, this idea has been challenged by others. Karagiannides and colleagues (2008) showed that LDLr-/- female mice (4-6 weeks old) were more resistant in developing hyperglicemia and glucose intolerance in response to western-type diet (21.1% fat content) for 15 weeks when compared to the WT mice, suggesting that LDLr deletion may have a protective effect on diet- induced obesity and metabolic disturbances. The discrepancies between these studies may reside in the difference of fat diet content employed where highest fat content could result in saturation of the metabolic pathways that control body fat deposition and glucose homeostasis, as suggested previously (Karagiannides et al., 2008). In addition, the animal age may have an influence (Collins et al., 2009) which can explain the fact that our LDLr-/- animals (16-20) weeks old) already became obese and presented metabolic alterations following only 8 weeks of high fat diet exposure.

It is well known that in T2DM pathogenesis, the intolerance to glucose is usually preceded by a peripheral insulin resistance state that can be associated or not with an impairment in insulin secretion (Peyot et al., 2010; Tripathy & Chaves, 2010; Prentki & Nolan, 2006; Rhodes, 2005). In our model, HF diet induced in WT mice, besides insulin resistance, a significant decrease (25%) in insulin secretory islet response to glucose mainly due to an increase in basal insulin output, that is in accordance with previous work (Collins et al., 2010). In addition, we described here for the first time that LDLr-/- mice when fed a HF diet display a much more severe impairment in the stimulated insulin secretion in comparison with the WT mice. The insulin secretory response of islets isolated from HFfed LDLr-/- mice was 50% lower than those from LF diet-fed LDLr-/- mice. Even under a low fat balanced diet, LDLr-/- mice showed a relatively low stimulated insulin secretion; this observation agrees with our previous work (Bonfleur et al., 2010). This markedly impairment in insulin secretion explains, at least partially, the relatively severe intolerance to glucose observed in LDLr-/- mice (fed a HF diet) that surprisingly did not displayed a significant insulin resistance. The mechanism underlying the reduced insulin secretion in response to glucose seen in LDLr-/- islets is still unknown. LDLr-/- beta cells do not internalize native lipoproteins such as LDL and VLDL, that are known to increase apoptosis rate and reduce the level of the insulin gene transcription (Roehrich et al. 2003). Nevertheless, it is possible that LDLr-/- beta cells may be susceptible to the harmful effects of oxidized LDL, that form and accumulate in these mice and can be taken up by a distinct type of receptors, the scavenger receptors (Palinski et al., 1995).

To unravel one possible mechanism that could explain, at least partially, the deleterious effect of high fat diet exposure and deletion of LDLr gene on insulin secretion, we investigated the level of Cx36 beta cell content in WT and LDLr-/- islets from mice that received LF diet or HF diet. Cx36 is the protein that forms the GJ channels between beta cells within the pancreatic islets (Carvalho *et al.*, 2010; Rupnik, 2009; Serre-Beinier *et al.*, 2009). A large body of evidence has accumulated indicating that GJ and its constitutive

protein are required for the fine regulation of the biosynthesis, storage and release of insulin, particularly in response to glucose (Carvalho et al., 2010; Leite et al., 2005; Calabrese et al., 2004, 2003; Le Gurun et al., 2003; Serre-Beinier et al. 2002). More recently, we have demonstrated that hypercholesterolemic and pre-diabetic WT mice, fed a HF diet, showed a significant reduction in Cx36 islet content, that correlated well with a significant decreased in beta cell-beta cell coupling mediated by GJs (Carvalho et al., 2009). In agreement with this data, Allagnat et al. (2008) demonstrated that in vitro chronic exposure to the free fat acid palmitate inhibits the Cx36 expression in beta cell line. Our hypothesis was that Cx36 down-regulation contributes to the reduced glucose sensitivity and altered insulin secretion in WT and LDLr-/- islets from mice fed a HF diet. If this was true, we would see a direct correlation between the decrease in Cx36 islet levels and a decrease in stimulated insulin secretion or a increase in levels of animal circulating cholesterol levels. Indeed, HF diet exposure elicited a decrease in Cx36 islet content in both WT and LDLr-/- mice; nevertheless, the effect was similar in both animals despite their marked differences in insulin secretory response. This result reinforces the idea that impairment of the Cx36-made GJ channels is involved in the altered insulin secretion observed during pre-diabetic stage. However, since reduced Cx36 islet content did not correlated directly with the decreased secretory response specifically in the case of the LDLr-/- islets, it is possible that other defects in the stimulus-secretory coupling process may be associated with LDLr gene deletion. For instance, it has been shown that initial key steps involving glucose uptake and metabolism are impaired in LDLr-/- mice fed a low fat diet (Bonfleur et al., 2010). Additional defects in more distal steps of insulin secretion process, including membrane depolarisation, Ca⁺² entry and changes in open/close state frequency of the GJ channels, may be also compromised in these animals fed a HF diet. It is a matter of future work to understand the effect of LDLr deficiency in insulin secretion.

Islet compensatory response to insulin resistance, involving increase in beta cell mass, is a recognized feature in obesity and T2DM (Prentki & Nolan, 2006; Rhodes 2005). Long-term regulation of beta cell mass is determined by the balance of beta cell growth, resulted of replication and neogenesis, and beta cell loss through apoptosis or necrosis

(Montanya & Téllez, 2009; Prentki & Nolan, 2006; Rhodes, 2005). Our WT mice fed a HF diet displayed a marked increase in beta cell mass probably due to mainly beta cell proliferation, as indicated by Ki67 immunoreaction. Interestingly, HF diet -fed LDLr-/mice showed no morphometric alterations indicative of hyperplasia of the endocrine pancreas despite the fact that the beta cell proliferation index was similar to that observed in WT mice. Beta cell apoptosis was not detected by TUNEL assay in any of the experimental groups. The next step was to evaluate the beta cell neogenesis in WT and LDLr-/- animals. For that, we have used indirect indicators such as the proximity of islets to pancreatic ducts and the presence of insulin-positive cells within the ductal epitelium or forming small clusters nearby the ducts (referred herein as insulin-positive ductal cells) (Gianani, 2011; Montanya & Téllez, 2009). Overall, our data suggest that the neogenesis process may be somehow impaired in endocrine pancreas of LDLr-/- mice. The evidences for that are two: 1) HF-fed LDLr-/- mice displayed a significant decrease in the frequency of islet-duct association in comparison to those fed a LF diet, and 2) the number of insulin-positive ductal cells per pancreas section area was 100 to 1000 fold lower in LDLr-/- mice as compared to WT ones. Nevertheless, further work is needed to determine the cellular pathways that lead to the apparent low remodeling capacity of the endocrine pancreas of LDLr-/- mice.

Taken all together, we demonstrated that hypercholesterolemia correlated well with the observed intolerance to glucose and reduced insulin secretion in both WT and LDLr-/mice fed a HF diet. The pre-diabetic state induced by HF diet intake is associated with a decreased Cx36 content in both WT and LDLr-/- islets that suggests a possible role of the GJ mediated intercellular communication in the pathogenesis of T2DM. The higher metabolic susceptibility to HF diet seen in LDLr-/- mice, as compared to WT, may be explained by a relatively high deficiency in insulin secretory response to glucose and absence of compensatory hyperplasia of the endocrine pancreas. So, we propose here that WT and LDLr-/- mice fed a HF diet for 60d constitute a suitable model for studying beta cell proliferation process and the deleterious effect of LDLr-/- deficiency on beta cell growth dynamic, respectively.

5 FIGURES



Figure 1. Plasma cholesterol, glucose, insulin levels and body weight gain in wild-type (WT) and LDLr-knockout (LDLr-/-) mice after high fat diet (HF). HF diet for 60 days induces significant increase in cholesterolemia (a), body weight gain (b), fast and post-prandial glycemia (c, d) in both mice (WT HF and LDLr-/- HF) as compared to those fed a low fat diet (WT and LDL-/-). Regarding the insulin plasma concentration (e), WT fed a HF showed a marked increase in plasma level of this hormone while a much smaller increase in this parameter was observed in HF diet-treated LDLr-/- mice. All values represent the mean + SEM. Data in panel (b) are expressed as percentage in relation to the initial weight value (before HF diet). In panel (e), the results are expressed as percentage in relation to the mean value of its own control group (fed a normal diet). Graph (a) n=19-35; (b) n=80-87; (c) n=37-48; (d) n=14-19 and (e) n=24-33 animals per group. *p<0.001 as compared to its respective control fed a LF diet (Student's t test). #p<0.001



Figure 2. Glucose and insulin tolerance test in WT and LDLr-/- mice fed a high fat diet (HF). After 60d treatment, both WT and LDLr-/- HF-fed mice display marked intolerance to glucose (a) as demonstrated by the incremental area under the curve (AUC) as depicted in panel b; values in a and b are mean + SEM of 10-13 mice per group. Regarding the insulin tolerance test (ITT) (c), only WT HF-fed mice present a significant insulin resistance as seen by the AUC depicted in panel d; values in c and d are mean + SEM of 15-21 mice per group.*p<0.02, **p<0.01 and ***p<0.001 as compared to its respective control group (fed a LF diet) (Student's t test).



Figure 3. Glucose-stimulated insulin secretion in islets from WT and LDLr-/- mice fed a low fat (LF) or high fat diet (HF). HF diet (for 60d) induces a significant increase in basal insulin secretion (2.8 mM) in WT islets (a) and a decrease in glucose-stimulated (16.7 mM) insulin release in LDLr-/- islets (c). Islets from both WT and LDLr-/- mice fed a HF diet displayed a significant reduction in insulin secretory response to glucose when compared to their control group fed a LF diet (b, d). Insulin release within the supernatant is expressed as mean + SEM (ng/islet.h) in a and c. In graphs b and d, the data are expressed as fold increase over basal mean value. The number of independent observations was three for WT and four for LDLr-/- group, n=20-30 microtubes with 5 fresh islets in each tube. *p<0.02; **p<0,005 and *** p<0,001 in comparison with its respective LF (Student's t test).

Figure 4. Cx36 distribution and cell content in the endocrine pancreas of WT and LDLr-/- mice fed a low fat (LF) or a high fat diet (HF).

Photomicrographs show the immunostaining for Cx36 in pancreatic islet sections of WT fed a LF (a) or HF diet (b) as well as of LDLr-/- mice fed a LF diet (c) or HF diet (d). Images e, f, g, h show double labeling for Cx36 and insulin in the same islets. They are representative of four independent experiments. Sonicates of isolated islets were immunoblotted for Cx36 (i). The protein was mostly detected in its dimeric (66 kDa) form. Densitometric evaluation, relative to the internal control β -actin (j), revealed a significant decrease of Cx36 in HF-fed mice (k). Values are the mean + SEM of 7 membranes from four independent experiments. Bar, 20 µm. *p <0.022 in comparison with its control group (Student's t test).



Figure 5. Histological and morphometric analysis of pancreas from WT and LDLr-/mice fed a low fat (LF) or high fat diet (HF).

Images a - d are endocrine pancreas sections processed for insulin immunoperoxidase from the different groups studied: WT (a), WT HF (b), LDLr-/- (c) and LDLr-/- HF (d). No significant morphological changes were observed in pancreatic islets of HF-fed animals in comparison with their respective controls (fed a normal diet). Nevertheless, HF diet induced a marked decrease in pancreas weight (e) and increase in islet (f) and beta cell masses (g), as well in islet number/section (h) in WT mice while LDLr-/- animals displayed no significant morphometric changes after HF diet for 60d. **p<0,01 and ***p<0,001 as compared to its respective LF control (Student's t test). Bar, 50 μ m.





f







Figure 6. Beta cell proliferation, as assessed by Ki67 immunolabelling, in pancreatic islets from WT and LDLr-/- mice after low fat (LF) or high fat diet (HF). Images show pancreatic islets of similar sizes immunolabelled for Ki67 (arrows), of WT (a), WT HF (b), LDLr-/- (c) and LDLr-/- HF (d) groups. WT mice after HF diet showed an increase of 220% in beta cell proliferation as compared to its control group (e), corroborating the data from morphometric analysis (see Figure 5). Surprisingly, the LDLr-/- mice also showed a high beta cell proliferation (increase of 265%) after HF. **p<0.005 and ***p<0.0001 in comparison with its respective LF group (Student's t test). Bar, 50µm.



Figure 7. Neogenesis in the endocrine pancreas of WT and LDLr-/- mice fed a low fat (LF) or a high diet (HF).

Images (a) and (c) are pancreas sections processed for insulin immunoperoxidase of HF-fed WT mice. Image (a) shows an islet associated with a duct while the image (c) shows insulin positive cells within the ductal epithelium. The painel (b) displays the percentage of large islets (\geq 5 cells) associated to ducts in relation to the total islet number. A total of 450-800 islets were analysed per group. In case of painel (d), all small clusters of insulin-positive cells (<5 cells) and ductal-insulin positive cells were counted and divided by the total area of the pancreas section. Data were obtained from six pancreas section from each animal (n= 4-6 animals/group) **p <0.05 as compared to its respective control (Student's t test). Bar, 50µm.



Figure 8. Apoptosis index, assessed by TUNEL technique, in pancreatic islets from WT and LDLr-/- mice after low fat (LF) or high fat diet (HF). Images show pancreatic islets of similar sizes of WT (a), WT HF (b), LDLr-/- (c) and LDLr-/- HF (d) mice. No cell apoptosis, as indicated by the absence of TUNEL reaction, was detected in any pancreas section analyzed. Image (e) depicts a positive control pancreas section after treatment with DNAse. Bar, 50µm.

6 REFERENCES

Ahrén, J., Ahrén, B. and Wierup, N. (2010). Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet: A dynamic study over 12 months. *Islets* **2**, 12-15.

Allagnat, F., Alonso, F., Martin, D., Abderrahmani, A., Waeber, G. and Haefliger, J. A. (2008). ICER-1gamma overexpression drives palmitate-mediated connexin36 down-regulation in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 283, 5226-34.

Bie, J., Zhao, B., Song, J. and Ghosh, S. (2010). Improved insulin sensitivity in high fatand high cholesterol-fed Ldlr-/- mice with macrophage-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase: role of macrophage inflammation and infiltration into adipose tissue. *J Biol Chem* **285**, 13630-7.

Bonfleur, M. L., Vanzela, E. C., Ribeiro, R. A., de Gabriel Dorighello, G., de França Carvalho, C. P., Collares-Buzato, C. B., Carneiro, E. M., Boschero, A. C. and de Oliveira, H. C. (2010). Primary hypercholesterolaemia impairs glucose homeostasis and insulin secretion in low-density lipoprotein receptor knockout mice independently of high-fat diet and obesity. *Biochim Biophys Acta* 1801, 183-90.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.

Calabrese, A., Caton, D. and Meda, P. (2004). Differentiating the effects of Cx36 and E-cadherin for proper insulin secretion of MIN6 cells. *Exp Cell Res* **294**, 379-91.

Calabrese, A., Zhang, M., Serre-Beinier, V., Caton, D., Mas, C., Satin, L. S. and Meda, P. (2003). Connexin 36 controls synchronization of Ca2+ oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetes* 52, 417-24.

Carvalho, C.P. (2009). Perda da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes no mecanismo de secreção de insulina em modelo in vivo de maturação e disfunção do pâncreas endócrino. *Tese de Doutorado*. UNICAMP.

Carvalho, C. P., Barbosa, H. C., Britan, A., Santos-Silva, J. C., Boschero, A. C., Meda, P. and Collares-Buzato, C. B. (2010). Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. *Diabetologia* **53**, 1428-37.

Coenen, K. R. and Hasty, A. H. (2007). Obesity potentiates development of fatty liver and insulin resistance, but not atherosclerosis, in high-fat diet-fed agouti LDLR-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E492-9.

Collins, A. R., Lyon, C. J., Xia, X., Liu, J. Z., Tangirala, R. K., Yin, F., Boyadjian, R., Bikineyeva, A., Praticò, D., Harrison, D. G. et al. (2009). Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res* 104, e42-54.

Collins, S. C., Hoppa, M. B., Walker, J. N., Amisten, S., Abdulkader, F., Bengtsson, M., Fearnside, J., Ramracheya, R., Toye, A. A., Zhang, Q. et al. (2010). Progression of diet-induced diabetes in C57BL6J mice involves functional dissociation of Ca2(+) channels from secretory vesicles. *Diabetes* **59**, 1192-201.

Del Prato, S. (2009). Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med* **26**, 1185-92.

Ding, Y. L., Wang, Y. H., Huang, W., Liu, G., Ross, C., Hayden, M. R. and Yang, J. K. (2010). Glucose intolerance and decreased early insulin response in mice with severe hypertriglyceridemia. *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 40-6.

Eto, M., Saito, M., Okada, M., Kume, Y., Kawasaki, F., Matsuda, M., Yoneda, M., Matsuki, M., Takigami, S. and Kaku, K. (2002). Apolipoprotein E genetic polymorphism, remnant lipoproteins, and nephropathy in type 2 diabetic patients. *Am J Kidney Dis* **40**, 243-51.

Fan, J. and Watanabe, T. (2000). Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 7, 26-32.

Gianani, R. (2011). Beta cell regeneration in human pancreas. *Semin Immunopathol* 33, 23-7.

Inuwa, I. M. and El Mardi, A. S. (2005). Correlation between volume fraction and volume-weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *J Anat* 206, 185-92.

Karagiannides, I., Abdou, R., Tzortzopoulou, A., Voshol, P. J. and Kypreos, K. E. (2008). Apolipoprotein E predisposes to obesity and related metabolic dysfunctions in mice. *FEBS J* **275**, 4796-809.

Le Gurun, S., Martin, D., Formenton, A., Maechler, P., Caille, D., Waeber, G., Meda, P. and Haefliger, J. A. (2003). Connexin-36 contributes to control function of insulinproducing cells. *J Biol Chem* 278, 37690-7.

Leite, A. R., Carvalho, C. P., Furtado, A. G., Barbosa, H. C., Boschero, A. C. and Collares-Buzato, C. B. (2005). Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 142-51.

Merat, S., Casanada, F., Sutphin, M., Palinski, W. and Reaven, P. D. (1999). Westerntype diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1223-30.

Montanya, E. and Téllez, N. (2009). Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. *Methods Mol Biol* 560, 137-58.

Palinski, W., Tangirala, R. K., Miller, E., Young, S. G. and Witztum, J. L. (1995). Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1569-76.

Peyot, M. L., Pepin, E., Lamontagne, J., Latour, M. G., Zarrouki, B., Lussier, R., Pineda, M., Jetton, T. L., Madiraju, S. R., Joly, E. et al. (2010). Beta-cell failure in dietinduced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes* **59**, 2178-87.

Poitout, V. and Robertson, R. P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* **29**, 351-66.

Prentki, M. and Nolan, C. J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-12.

Rhodes, C. J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* **307**, 380-4.

Roehrich, M. E., Mooser, V., Lenain, V., Herz, J., Nimpf, J., Azhar, S., Bideau, M., Capponi, A., Nicod, P., Haefliger, J. A. et al. (2003). Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J Biol Chem* **278**, 18368-75.

Rupnik, M. (2009). All together now: exocytose or fail. Islets 1, 78-80.

Schreyer, S. A., Vick, C., Lystig, T. C., Mystkowski, P. and LeBoeuf, R. C. (2002). LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E207-14.

Serre-Beinier, V., Bosco, D., Zulianello, L., Charollais, A., Caille, D., Charpantier, E., Gauthier, B. R., Diaferia, G. R., Giepmans, B. N., Lupi, R. et al. (2009). Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression. *Hum Mol Genet* **18**, 428-39.

Serre-Beinier, V., Mas, C., Calabrese, A., Caton, D., Bauquis, J., Caille, D., Charollais, A., Cirulli, V. and Meda, P. (2002). Connexins and secretion. *Biol Cell* **94**, 477-92.

Sone, H. and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 48, 58-67.

Suckale, J. and Solimena, M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci* 13, 7156-71.

Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A. and Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* **37**, 1163-7.

Tripathy, D. and Chavez, A. O. (2010). Defects in insulin secretion and action in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* **10**, 184-91.

Winzell, M. S. and Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S215-9.

Possível Envolvimento Da Via De Sinalização WNT/Beta-Catenina Na Hiperplasia Compensatória Da Célula Beta Pancreática Em Modelo Animal De Diabetes Tipo 2

1 INTRODUÇÃO

A incidência de diabetes melito tem crescido consideravelmente nas últimas décadas. Estimativas mostram que esta desordem endócrina/metabólica pode atingir mais de 300 milhões de pessoas em todo mundo em 2030 (Wild *et al.*, 2004). Dentre os tipos de diabetes, a diabetes melito tipo 2 (T2DM) tem uma incidência e prevalência maior, cujo número de portadores vem aumentando devido ao crescente sedentarismo e obesidade associados ao estilo de vida ocidental. O quadro de T2DM é caracterizado por moderada hiperglicemia associada à resistência periférica à insulina e relativa deficiência de insulina circulante (American Diabetes Association, 2011). As alterações metabólicas que precedem a diabetes tipo 2 são acompanhadas por alterações compensatórias do pâncreas endócrino, como aumento na secreção de insulina e/ou hiperplasia/hipertrofia da célula beta (Sone & Kagawa, 2005).

Há um grande interesse na determinação das vias envolvidas na proliferação da célula beta, devido à possibilidade da aplicação deste conhecimento na terapia celular da diabetes (Yelsin & Lammert, 2008). Em especial, a via de sinalização da Wnt/beta-catenina tem sido pouco investigada no pâncreas endócrino. Em outros tecidos/órgãos, a beta-catenina constitui não somente um componente estrutural das junções de adesão (Collares-Buzato, 2007), mas também é uma molécula sinalizadora juntamente com as Wnts, as quais são importantes em vários processos celulares, tais como diferenciação e proliferação (Jin *et al.*, 2008; Murtaugh, 2008). No pâncreas, em particular, tem sido demonstrado o envolvimento da via Wnt/beta-catenina na organogênese deste órgão (Murtaugh *et al.*, 2005; Heller *et al.*, 2002).

A sinalização da via Wnt/beta-catenina (via canônica) ocorre a partir da ligação de uma das proteínas da família Wnt a receptores de membranas denominados *Frizzled*, que juntamente com a proteína relacionada à LDL (LRP, do inglês, *Low-Density Lipoprotein Receptor Related Protein*), iniciará uma cascata de reações no meio intracelular (Angers & Moon, 2009). O complexo protéico composto por Axina, APC (do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*), GSK3β (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3β*) e CK1 (do inglês, *Casein Kinase 1*) são responsáveis pela fosforilação da beta-catenina livre no citoplasma, encaminhando-a para degradação em proteossomos (Murtaugh *et al.*, 2008). Quando há sinalização pelas proteínas da Wnt, este complexo é inativado por *Frizzled*, LRP e *Dishevelled* levando a um aumento da concentração intracelular de beta-catenina. Com o acúmulo de beta-catenina livre no citoplasma, há migração dessa proteína para o núcleo e associação com TCF /LEF1 (do inglês, *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) induzindo a transcrição dos genes alvo da Wnt, como por exemplo, a ciclina D1 e c-Myc que atuam como indutores de crescimento e proliferação celular (Champeris Tsaniras & Jones, 2010; Angers & Moon, 2009; Murtaugh *et al.*, 2008; Hoppler & Kavanagh, 2007).

Este trabalho teve como objetivo investigar a possível ativação da via Wnt/betacatenina durante o processo de proliferação compensatória da célula beta frente à resistência periférica induzida em camundongos por dieta hiperlipídica por curto período (60 dias).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados, neste trabalho, camundongos C57BL/6 (*wild-type*, WT), machos, com 16 a 20 semanas (4 a 5 meses) de idade. Todos os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (Campinas, SP) e mantidos em condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro (de 12h), alimentados com ração e água *ad libitum* até o momento da experimentação. Os experimentos deste projeto foram aprovados pela

Comissão de Ética na Experimental Animal da instituição (CEEA-IB-UNICAMP) (protocolo no. 1884-1).

2.2 DIETA

Os camundongos do grupo tratado foram colocados em dieta com uma ração preparada no laboratório com alto teor de lipídios (HF) (21% em peso; 40,3% em kcal) por 60 dias. A composição desta ração (em pó) está mostrada na **Tabela I**. Os camundongos controles receberam uma ração balanceada com conteúdo normal de lipídios (4,5% em peso, 8,0 % em kcal; ração padrão em pó; Nuvital CR-1, Colombo, PR) pelo mesmo período de tempo. Os conteúdos de sais minerais e vitaminas na ração hiperlipídica foram, aproximadamente, os mesmos da ração padrão.

Tabela I – Composição das raço

Componentes g%	Ração Normal	Ração Hiperlipídica
Proteínas	22,0	20,0
Carboidratos	53,0	50,0
Lipídios	4,5	21,0
Outros*	20,5	8
kcal/g	2,9	4,7

* Fibras, vitaminas e sais minerais

2.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO PÂNCREAS

A análise morfológica do pâncreas endócrino dos animais dos dois grupos experimentais (n=5 animais por grupo experimental) foi feita utilizando-se técnica histológica de rotina. Para tal, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 para retirada dos pâncreas; estes foram pesados e fixados em solução de Bouin (25% de formaldeído, 75% de ácido pícrico saturado e 5% de ácido acético) ou de paraformaldeído

4% (diluído em 0,05 M de Tampão Trisma Base em salina, pH 7,4; TBS). por 16-18 horas. Após fixação, cada pâncreas foi seccionado em 5 fragmentos (1, correspondendo à cabeça, a 5, região da cauda). Em seguida, cada fragmento foi processado pelas técnicas rotineiras de embebição em parafina (Histosec pastilhas, Merck, Darmstadt - Alemanha). Três dos fragmentos foram selecionados de uma maneira sistemática (Inuwa & Mardi, 2005) (fragmentos 1, 3 e 5) e, de cada fragmento, foram obtidas secções semi-seriadas de 5 μm (com espaçamento de 100 μm entre cortes) até esgotamento total do bloco. As lâminas obtidas foram processadas para imunoistoquímica para insulina ou beta-catenina.

2.4 IMUNOISTOQUÍMICA PARA BETA-CATENINA OU INSULINA

Os cortes de pâncreas foram, inicialmente, desparafinizados e hidratados seguindo um protocolo de rotina. No caso específico da reação para beta-catenina, os cortes foram submetidos à exposição antigênica com uma solução tampão de citrato de sódio (0,01M em água MilliQ, pH 7,6) por 1h em panela a vapor. Após lavagem com TBS, foi feito bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio (em metanol) por 30 min seguido de incubação com 5% de leite em pó desnatado em solução de 0,1% Tween 20/TBS (TTBS) por 1h. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo antibeta-catenina (Zymed, South San Francisco, CA - USA) (produzido em camundongo, diluição 1:50 em TBS contendo 3% de leite em pó desnatado) ou anti-insulina (Dako, Glostrup - Denmark) (produzido em cobaia, diluição 1:150 em TBS contendo 3% de leite em pó desnatado) por 12h a 4°C. Após lavagem com TBS, os cortes foram incubados com anti- IgG de camundongo conjugado com peroxidase (HRP) (Sigma, St Louis, MO - USA) (no caso da reação para beta-catenina) ou com anti-IgG de cobaia conjugado com HRP (Sigma) (diluição 1:1500 em TBS contendo 1% de leite em pó desnatado), por 1h e 30min à temperatura ambiente (TA). A revelação do complexo antígeno-anticorpo foi feita com uma solução contendo 10% de diaminobenzidina (DAB) (Sigma) e 0,2% de peróxido de hidrogênio (Merck) em TBS. Finalmente, após lavagens com água destilada, os cortes foram rapidamente contra-corados com uma solução aquosa de Hematoxilina de Ehrlich (diluída 1:10 em água destilada), desidratados em soluções crescentes de etanol e, montados em Bálsamo Sintético do Canadá (Synth - Brasil) para observação ao microscópio de luz.

2.5 MORFOMETRIA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

As lâminas obtidas a partir do processamento dos pâncreas e imunoistoquímica para insulina, descritos anteriormente, foram utilizadas para a análise morfométrica do órgão. Foram analisados os seguintes parâmetros: 1) área absoluta e relativa de célula beta/célula não-beta, 2) área absoluta e relativa da ilhota/pâncreas, 3) massa estimada (mg) do pâncreas endócrino; 4) massa estimada (mg) de célula beta por pâncreas e 5) número médio de ilhotas por secção transversal. Para tal, foram utilizados métodos estereológicos descritos na literatura, com pequenas modificações (Inuwa & Mardi, 2005; Sone & Kagawa, 2005). Todas as ilhotas (com ou mais de 5 células cada) de dois cortes de cada bloco (1, 3 e 5;número total de cortes analisados = 6 por animal) do pâncreas foram fotografadas com uma câmera digital (Nikon FDX-35) acoplada a um microscópio de luz (Nikon Elipse E800) e as imagens capturadas por um sistema de análise de imagens (Image Pro Plus for Windows). As imagens das secções do pâncreas foram fotografadas com uma câmera digital (Nikon) acoplada a uma lupa (Nikon). Todas as medidas morfométricas foram feitas utilizando o software livre ImageTool (http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html). A área *relativa de célula beta* foi expressa em porcentagem, a qual foi determinada pela divisão da área total de células positivas para insulina pela área da ilhota e multiplicando-se por 100. A área relativa das ilhotas foi expressa em porcentagem, a qual foi determinada pela divisão da somatória das áreas totais das ilhotas pela área de secção transversal do pâncreas e multiplicando-se por 100. A estimativa da *massa total de ilhotas* (mg) foi calculada multiplicando-se o peso do pâncreas pela área relativa das ilhotas. A estimativa da massa *total de célula beta* (mg) foi calculada multiplicando-se a massa total de ilhotas pela área relativa de célula beta. Todas as ilhotas amostradas foram somadas e divididas pelo número de cortes analisados para expressar o número de ilhotas por secção transversal.

2.6 ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NO PÂNCREAS ENDÓCRINO

A proliferação das células endócrinas foi determinada em cortes de pâncreas incluídos em parafina e marcados para Ki67 pelo método de imunoperoxidase indireta. Para tal, os pâncreas foram fixados em paraformaldeído 4% (Sigma) por 16-18 horas, seccionados em 3 fragmentos (A, cabeça; B, corpo; C, cauda), os quais foram incluídos em parafina (Merck). Para a reação, foram utilizados 2 cortes por fragmento correspondente ao corpo e a cauda (fragmentos B e C) de cada animal. Após desparafinização e desidratação dos cortes, a recuperação antigênica foi realizada em uma panela a vapor com tampão citrato de sódio (0,01 M, pH 6,0) por 1h. Em seguida os cortes foram lavados em TBS, permeabilizados com uma solução de 0,1% Triton X-100 em TBS por 10 min, novamente lavados em TBS e, então, realizado o bloqueio da peroxidase endógena por 20 min à TA com uma solução contendo 3% H₂O₂ em metanol. Posteriormente, os cortes foram lavados em TBS e submetidos à solução bloqueadora (TTBS; TBS, 0,1% Tween 20 e 3% leite em pó desnatado) por 1h à TA. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em TBS e incubados por 12h a 4°C com anticorpo primário anti-Ki67 (Dako), diluído 1:20 em TBS contendo 1% de leite em pó desnatado. Após incubação, os cortes foram lavados em TBS e incubados novamente com o anticorpo secundário biotinilado específico (Dako, diluição 1:75 em TBS contendo 1% de leite em pó desnatado) por 45 min à TA. Os cortes foram, então, lavados com TBS e incubados com estreptoavidina-HRP (Kit LSAB, Dako) por 30 min à TA. Em seguida, a reação foi revelada com DAB, e os cortes contra-corados e montados para observação em microscopia de luz. Todas as ilhotas dos cortes foram fotografadas e o índice de proliferação celular nas ilhotas foi estimado contando-se o número de células positivas para Ki67 e dividindo pelo número total de células endócrinas na ilhota (Sone & Kagawa, 2005).

2.7 CO-LOCALIZAÇÃO DE BETA-CATENINA E INSULINA EM CORTES DE Congelamento De Pâncreas

Os pâncreas foram congelados em n-hexano com nitrogênio líquido e cortados em criostato (cortes com 8 µm espessura). Os cortes foram fixados com acetona a -20°C por 3

minutos e mantidos a -20°C até o momento de reação de imunofluorescência. Todas as secções foram incubadas por 1h com solução de TBS contendo 5% de leite em pó desnatado e, em seguida incubadas, seguido de incubação com o anticorpo primário (antibeta-catenina; Zymed) (diluição 1:150 em TBS contendo 3% leite em pó desnatado) por 2h à TA. Posteriormente, foi feita a incubação dos cortes com o anticorpo secundário específico marcado com fluoresceína (FITC) (Sigma) (diluição 1:200 em TBS contendo 1% leite em pó desnatado [wt/vol]) por 2h à TA. Em seguida, as secções foram incubadas por 1h e 30min com anti-insulina (Dako) (diluição 1:200 em TBS contendo 1% de leite em pó desnatado) e anticorpo secundário específico conjugado com rodamina (TRITC) (Sigma, diluição 1:300 em TBS contendo 1% de leite em pó desnatado). Finalmente, as secções foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories, USA) e observadas através de microscópio de varredura confocal a laser (LSM 510 META; Zeiss, Hamburg – Alemanha). Para fazer a análise comparativa entre os grupos estudados, as secções dos diferentes animais foram processadas e analisadas por imunofluorescência durante a mesma sessão, utilizando os mesmos parâmetros do microscópio confocal. Para o controle negativo, secções foram incubadas com TBS contendo 3% leite em pó desnatado ao invés do anticorpo primário; a omissão do anticorpo primário não resultou em marcação das células das ilhotas.

2.8 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

Para isolamento de ilhotas, foram injetados no pâncreas 3mL de solução de colagenase tipo V (EC 3.4.24.3, Sigma) (1,7mg/mL em solução de Hanks, pH 7,4; composição: NaCl 136 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂.2H₂O 1,26 mM, MgSO₄.7H₂O 0,81 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, NaHCO₃ 4,2 mM pH 7,4, suplementada com 5,6 mM de glicose e 1 mg/mL de albumina). O pâncreas foi, posteriormente, incubado a 37°C por 24 min. A suspensão de ilhotas obtida foi lavada três vezes com solução de Hanks para remoção da colagenase. Após a separação com Histopaque 1077 (Sigma), as ilhotas pancreáticas foram coletadas individualmente sob lupa. As ilhotas coletadas foram homogeneizadas em coquetel anti-protease para procedimento de *Western Blot*.

2.9 WESTERN BLOT

Alíquotas contendo, aproximadamente, 300 ilhotas de cada grupo experimental foram homogenizados, com o auxílio de um sonicador, em coquetel anti-protease (composição: 10 mM imidazol pH 7,4; 4 mM EDTA; 1 mM EGTA; 200 µM DTT; 0,5 μg/mL pepstatina; 200 KIU/mL aprotinina; 200 μM fenilmetilsufonilfluoreto; 2,5 μg/mL leupeptina e 30 µg/mL inibidor de tripsina). A quantificação de proteínas totais nos homogeneizados foi feita através do método de Bradford utilizando o reagente da Bio-Rad (Hercules, CA - USA). Uma quantidade de 50 µg de cada amostra foi incubada por 1h a 37°C com 30% em volume de tampão amostra Laemmli (5x concentrado) (Carvalho, 2010) e, posteriormente, aplicada em gel de 8% de acrilamida. Em seguida, as proteínas foram separadas através de eletroforese e transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocellulose (Bio-Rad). A membrana foi corada com solução Ponceau S (Sigma) para confirmação da transferência adequada das proteínas. Para detecção das proteínas, as membranas foram bloqueadas overnight a 4°C com TTBS contendo 5% leite em pó desnatado. Em seguida, as membranas foram incubadas à TA por 2 h com anticorpo primário (Tabela II) diluído em TTBS contendo 3% leite em pó desnatado. Após lavagens com TTBS, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com HRP (Tabela II) por 1h à TA diluído em TTBS contendo 1% de leite em pó desnatado. As membranas foram lavadas novamente, e a detecção dos anticorpos foi feita utilizando-se o kit de quimioluminescência SuperSignal (Thermo Fisher Scientific - USA) e filme radiográfico (Amersham - USA). O tamanho das bandas foi quantificado por densitometria óptica utilizando o programa Image J (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Como o controle interno da quantidade de proteínas aplicada no gel, as membranas foram reincubadas com o anticorpo anti-beta-actina após serem submetidas ao processo de "stripping", que consiste na remoção dos anticorpos através da incubação da membrana com tampão stripping (tampão fostafato de sódio 0,05 M, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 0,1 M) a 60°C por 5 min. Os valores da densitometria óptica foram expressos como razão entre o valor da banda da proteína alvo pelo valor da banda de beta-actina (controle interno). A especificidade dos anticorpos foram confirmados em amostras de células da linhagem celular prostática cancerosa LNCaP.

Primário		Secundário	
Anti-beta-catenina	1:800	Anti-mouse IgG HRP	1:2500
Anti-beta-catenina ativada	1:500	Anti-mouse IgG HRP	1:2000
Anti-ciclina D	1:200	Anti-rabbit IgG HRP	1:1500
Anti-c-Myc	1:150	Anti-rabbit IgG HRP	1:1000
Anti-beta-actina	1:700	Anti-mouse IgG HRP	1:1500

Tabela II. Diluições anticorpos

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como media \pm erro padrão da média (SEM). Análise estatística foi realizada com auxilio do software GraphPad Prism Version 4.00 for Windows (GraphPad Software, USA). A significância estatística entre dois grupos experimentais foi determinada usando-se o teste t- de Student uni ou bicaudal. O nível de significância adotado foi de p<0,05.

3 RESULTADOS

Como demonstrado no capítulo 2 dessa dissertação, a dieta hiperlipídica (HF) por 60 dias induz em camundongos C57BL/6, *wild-type* (WT), de ambos os sexos, alterações metabólicas típicas do estado de pré-diabetes, ou seja, hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência periférica à insulina. Este estado de resistência periférica à insulina foi associado, em ambos os sexos, com uma hiperplasia compensatória da massa de célula beta (Capitulo II). Esses dados foram confirmados aqui quando se avaliou somente animais machos. Como observado na Tabela III, a dieta HF induziu aumento na área da ilhota, na área da célula beta com conseqüente aumento de massa total tanto das ilhotas como das células beta. A análise morfométrica do pâncreas endócrino também

revelou um aumento no número de ilhotas por secção histológica nos animais submetidos à dieta HF. Ainda, a análise de proliferação celular, pela imunomarcação da proteína Ki67, mostrou que as células betas das ilhotas de animais alimentados com dieta HF apresentaram uma maior taxa de replicação quando comparada aos animais do grupo controle (0,28 \pm 0,058 [n=114] x 0,83 \pm 0,14 [n=80] p=0,0001, células Ki67+/células totais da ilhota; WT x WT HF respectivamente), corroborando, assim, os dados da morfometria.

Com o propósito de investigar a possível ativação da via Wnt/beta-catenina, foi avaliada a distribuição celular da beta-catenina em cortes histológicos de pâncreas. Segundo a literatura, a localização citoplasmática ou nuclear dessa proteína frequentemente está associada à ativação dessa via de sinalização (Schohl & Fagotto, 2002). Como mostra a Figura 1 a e b, a imunolocalização da beta-catenina foi similar nas ilhotas pancreáticas de ambos os grupos experimentais. Ainda, foi realizada uma imunofluorescência indireta para beta-catenina e insulina para melhor localização de beta-catenina no caso de possível acúmulo desta proteína no citoplasma ou no núcleo de células beta pancreáticas (Figura 1 c e d). No entanto, a imunorreação para beta-catenina revelou uma localização na região de contato intercelular tanto em ilhotas do grupo controle como as do tratado.

Ainda, foi analisada a expressão protéica de algumas proteínas envolvidas na via Wnt/beta-catenina através de *Western Blot*. A densitometria revelou um pequeno aumento, não significativo, no conteúdo celular de beta-catenina total em homogeneizados de ilhotas dos animais alimentados com dieta HF em comparação com os do grupo controle (Figura 2). Já a expressão protéica de beta-catenina ativada (forma desfosforilada) apresentou um aumento significativo em ilhotas do grupo tratado em relação ao grupo controle (Figura 3).

No que diz respeito à expressão de c-Myc, os grupos não apresentaram diferença entre si (Figura 4). No entanto, observou-se um pequeno aumento, porém significativo (p<0,05) de ciclina D nos animais tratados com dieta HF quando comparados aos animais controles (Figura 5).

4 DISCUSSÃO

Com a crescente incidência de T2DM, tem havido um grande interesse no desenvolvimento de novos processos e metodologias que possam ser aplicados na terapia celular da T2DM (Tahara *et al.*, 2011; Yelsin e Lammert 2008). Para tal, existem modelos para estudo que avaliam, por exemplo, a disfunção secretora da célula beta, o desenvolvimento de resistência periférica à insulina, o comprometimento da sinalização intracelular de insulina entre outras complicações associadas à T2DM. A linhagem de camundongo C57BL/6 tem sido amplamente empregada para o estudo de T2DM, pois se apresenta como um modelo robusto para indução dos distúrbios metabólicos característicos desta doença através da administração de dieta hiperlipídica e/ou glicocorticóides como dexametasona (Ghaisas *et al.*, 2009; Winzell & Ahrén 2004). Partindo desta premissa, induzimos um estado de pré-diabetes em camundongos C57BL/6 com emprego de dieta HF por 60 dias, em conseqüência foi observado alterações na massa do pâncreas endócrino (hiperplasia), o que nos levou a verificar a possível ativação da via Wnt/beta-catenina no pâncreas endócrino destes animais.

Como mencionado anteriormente, a via Wnt/beta-catenina é ativada quando proteínas da família das Wnts se ligam aos receptores específicos de membrana, denominados *Frizzled*. A ativação desses receptores resulta em fosforilação das proteínas intracelulares denominadas *Dishevelled*, as quais, por sua vez, bloqueiam a enzima GSK3β, que normalmente fosforila a beta-catenina. Como resultado disto, beta-catenina não fosforilada (ativada) acumula-se no citoplasma e é translocada para o núcleo interagindo com o complexo protéico TCF/LEF e ativando a transcrição de determinados genes (Angers & Moon, 2009). Estudos visando identificar um possivel envolvimento dessa via em processos fisiopatológicos ou experimentais que resultem em sua ativação têm utilizado como estratégias: 1) o uso de animais com "perda e ganho de função" (*loss-of-function; gain-of-function*) de determinadas proteínas associadas à via, 2) a análise da distribuição celular da beta-catenina, cuja presença no citoplasma e núcleo indica ativação e 3) a análise da expressão gênica e protéica de agonistas ou antagonistas da via Wnt/beta-catenina.

Trabalhos têm mostrado que a via Wnt/beta-catenina está envolvida nos processos de desenvolvimento e morfogênese de diversos tecidos e órgãos, tais como o encéfalo e medula espinhal (Li *et al.*, 2005), rim (Kispert *et al.*, 1998), e fígado (Thompson & Monga, 2007). Ainda, como demonstrado por Paige e colaboradores (2010), a diferenciação de células tronco embrionárias humanas em células cardíacas (cardiomiócitos) envolve a ativação da via Wnt/beta-catenina e "*cross-talking*" entre essa via e aquela mediada pela activina A/BMP4. No fígado, a via Wnt/beta-catenina está associada não somente ao desenvolvimento deste órgão como ao crescimento, regeneração e metabolismo hepático de glicose, glicogênio e lipídios, sugerindo que essa via desempenharia também um papel na regulação da homeostase funcional do fígado (Liu *et al.*, 2011; Thompson & Monga, 2007).

A via Wnt/beta-catenina tem sido também estudada no pâncreas, em particular nos diferentes estágios da organogênese deste órgão. Tem sido demonstrado que, durante o desenvolvimento inicial do endoderma, a inibição da via Wnt/beta-catenina é necessária para a especificação do pâncreas (revisão por Murtaugh, 2008). Entretanto, o crescimento e diferenciação das linhagens celulares no pâncreas fetal dependem da ativação dessa via. Heller e colaboradores (2002) demonstraram que durante o desenvolvimento do pâncreas ocorre expressão de cinco proteínas da família Wnt e oito membros de receptores *Frizzled*, bem como a expressão de *Dishevelled*, beta-catenina e GSK3β. Essa ativação parece particularmente importante no caso das células acinares pancreáticas, cuja especificação e diferenciação dependem da função da beta-catenina. Pâncreas de camundongos *knockout* para beta-catenina apresentam hipoplasia acentuada da porção exócrina (Wells *et al.*, 2007), enquanto que, a inativação do gene que codifica a proteína APC, um inibidor da via de sinalização Wnt/beta-catenina, resulta em hiperplasia do pâncreas exócrino. (Strom *et al.*, 2007)

Quanto ao papel da via da Wnt/beta-catenina no desenvolvimento e função das células endócrinas pancreáticas, incluindo a célula beta, este permanece controverso. Dessimoz e colaboradores (2005) observaram, em camundongos *knockout* condicional para beta-catenina, uma pequena diminuição na massa da ilhota pancreática associada a um quadro de pancreatite. Murtaugh e colaboradores (2005), por sua vez, utilizando animal
knockout para beta-catenina específica do pâncreas, sugeriram que esta proteína desempenha uma função no desenvolvimento de células acinares progenitoras, contudo mostraram que o pâncreas endócrino desenvolveu-se normalmente na sua ausência. Em contraste, um trabalho independente, utilizando embriões de galinha, relatou que a ativação da beta-catenina inibe a diferenciação do pâncreas endócrino devido a um comprometimento da expressão gênica da neurogenina 3 (um dos marcadores da célula beta) (Pedersen *et al.*, 2005). Em condições *in vitro*, Wnt3a e meio condicionado de adipócitos (rico em proteínas Wnts) induziram proliferação celular e a secreção de insulina em linhagem de célula beta Ins-1, via ativação da expressão gênica de ciclina D1(Schinner *et al.* 2008).

Com o intuito de se estudar o papel da via Wnt/beta-catenina na hiperplasia da célula beta em condições in vivo e na fase adulta, utilizamos camundongos C57BL/6, wild*type* que foram tratados com uma dieta hiperlipídica (contendo 21%g de lipídios) por 60d. Nessas condições, os camundongos tornaram-se obesos e pré-diabéticos. O estado de resistência periférica à insulina apresentado por esses animais foi associado com uma hiperplasia compensatória da massa de célula beta. Nossos dados mostram um aumento significativo de beta-catenina ativada (desfosforilada) em ilhotas de animais alimentados com dieta HF, sendo que o acúmulo desta proteína é uma marca clara de ativação da via Wnt canônica (Murtaugh et al.; 2005). Ainda, os animais submetidos à dieta HF apresentaram aumento do conteúdo celular de ciclina D, indicando proliferação das células das ilhotas desses animais. Levando-se em consideração esses dados preliminares, a via Wnt/beta-catenina parece estar ativada durante o processo de hiperplasia do pâncreas endócrino observada no nosso modelo animal. Entretanto, o fato da beta-catenina não ter sido imunodetectada no citoplasma e/ou núcleo das células beta nessas condições, indica que experimentos adicionais serão necessários para confirmar a ativação in vivo da via Wnt/beta-catenina no pâncreas endócrino. Entretanto, a importância dessa via na patogênese da T2DM tem sido reforçada pelas recentes descobertas em genética humana mostrando a relação entre polimorfismos no gene de TCF7L2 (um dos membros da familía TCF/LEF) e uma predisposição para T2DM (Grant et al., 2006).

Grupo	Peso pâncreas mg (N)	Área ilhota μm² (n)	Área de célula beta μm² (n)	Massa ilhota mg (N)	Massa célula beta mg (N)	N ilhotas/secção
♂ WT	195.0 ± 17.85 (5)	7018 ± 597.2 (269)	5861 ± 507.1 (269)	0.8505 ± 0.08891 (5)	0.6496 ± 0.09391 (5)	8.964 ± 0.6028 (5)
ੈ WT HF	184.2 ± 18.36 (5)	11030 ± 935.6 (399)* (p<0,002)	9519 ± 822.7 (399)* (p<0,001)	2.100 ± 0.3043 (5)* (p<0,005)	1.799 ± 0.2690 (5)* (p<0,004)	13.30 ± 1.439 (5)* (p<0,03)

Tabela III. Análise de parâmetros morfométricos do pâncreas endócrino de camundongos C57BL/6 machos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (HF) por 60 dias.

Os dados apresentados nessa tabela correspondem à média \pm SEM (N). O asterisco representa uma diferença significativa entre o grupo tratado com a dieta HF e seu respectivo controle, (N) o número de animais e (n) o número de ilhotas analisadas.

5 FIGURAS



Figura1. Imunolocalização de beta-catenina em cortes histológicos de pâncreas endócrino de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (HF).

Imagens a e b mostram cortes de pâncreas processados por imunoperoxidase para betacatenina em camundongos submetidos à dieta normal (a) ou HF (b) por 60 dias. Não foi observada diferença na marcação para esta proteína nos diferentes grupos estudados. Já as imagens c e d mostram secções de pâncreas congelados e processados por imunofluorescência para co-localização de beta-catenina (verde – FITC) e insulina (marcação em vermelho – TRITC) em animais controle (a) e tratados com dieta HF (b). Em ambos os grupos, a imunoreação não revelou marcação consistente de beta-catenina fora da região da membrana plasmática. Em a e b, barra, 50µm; em c e d, barra 20µm.



Figura 2: Expressão protéica de beta-catenina em ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (HF).

A imagem (a) mostra a detecção de beta-catenina através de *Western Blot* em homogeneizados de ilhotas pancreáticas de animais alimentados com dieta controle (WT) ou HF por 60 dias (WT HF). Para o controle interno da quantidade de proteína total aplicada, a membrana foi submetida ao procedimento de "stripping" e re-incubada com o anticorpo anti-beta-actina (b). Em (d) estão mostrados os valores da densidade óptica de beta-catenina normalizados em relação aos valores obtidos para beta-actina. A análise estatística não revelou diferença significativa entre os grupos estudados. Em (c) mostra o controle positivo para articorpo beta-catenina em linhagem celular de câncer prostático (LNCaP). Foram analisadas 4 membranas, provenientes de 4 experimentos independentes.



Figura 3: Expressão protéica de beta-catenina ativada em ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (HF).

A imagem (a) mostra a detecção de beta-catenina ativada (forma desfosforilada) através de *Western Blot* em homogeneizados de ilhotas pancreáticas de animais alimentados com dieta controle (WT) ou HF por 60 dias (WT HF). Para o controle interno da quantidade de proteína total aplicada, a membrana foi submetida ao procedimento de "stripping" e re-incubada com o anticorpo anti-beta-actina (b). Em (d) estão mostrados os valores da densidade óptica de beta-catenina normalizados em relação aos valores obtidos para beta-actina. O conteúdo protéico de beta-catenina ativada foi significativamente maior em ilhotas de animais tratados com HF em comparação com ilhotas de animais do grupo controle (* p<0.05, teste t de Student, unicaudal) entre os grupos estudados. Em (c) mostra o controle positivo para beta-catenina ativada em linhagem celular de câncer prostático (LNCaP). Foram analisadas 3 membranas, provenientes de 2 experimentos independentes.



Figura 4: Expressão protéica de c-Myc em ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (HF).

A imagem (a) mostra a detecção de c-myc através de *Western Blot* em homogeneizados de ilhotas de animais alimentados com dieta controle (WT) ou HF por 60 dias (WT HF). Para o controle interno da quantidade de proteína total aplicada, a membrana foi submetida ao procedimento de "stripping" e re-incubada com o anticorpo anti-beta-actina (b). Em (d) estão mostrados os valores da densidade óptica de c-myc normalizados em relação aos valores obtidos para beta-actina. A análise da densitometria não revelou diferença entre os grupos estudados (n=1). Em (c) mostra o controle positivo para c-myc em linhagem celular de câncer prostático (LNCaP).



Figura 5: Expressão protéica de ciclina D em ilhotas pancreáticas de camundongos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica (HF).

A imagem (a) mostra a detecção de ciclina D através de *Western Blot* em homogeneizados de ilhotas de animais alimentados com dieta controle (WT) ou HF por 60 dias (WT HF). Para o controle interno da quantidade de proteína total aplicada, a membrana foi submetida ao procedimento de "stripping" e re-incubada com o anticorpo anti-beta-actina (b). Em (d) estão mostrados os valores da densidade óptica de ciclina D normalizados em relação aos valores obtidos para beta-actina. O conteúdo protéico de ciclina D foi significativamente maior em ilhotas de animais tratados com HF em comparação com ilhotas de animais do grupo controle (* p<0,05, teste t de Student, bicaudal) entre os grupos estudados. Em (c) mostra o controle positivo para ciclina D em linhagem celular de câncer prostático (LNCaP). Foram analisadas 2 membranas, provenientes de 2 experimentos independentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **34 Suppl 1**, S62-9.

Angers, S. and Moon, R. T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 468-77.

Carvalho, C. P., Barbosa, H. C., Britan, A., Santos-Silva, J. C., Boschero, A. C., Meda, P. and Collares-Buzato, C. B. (2010). Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. *Diabetologia* 53, 1428-37.

Champeris Tsaniras, S. and Jones, P. M. (2010). Generating pancreatic beta-cells from embryonic stem cells by manipulating signaling pathways. *J Endocrinol* **206**, 13-26.

Collares-Buzato, C.B. (2007). Junções Celulares. *In:* A Célula. Eds: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. Editora Manole, Barueri, pp. 92-112.

Dessimoz, J., Bonnard, C., Huelsken, J. and Grapin-Botton, A. (2005). Pancreasspecific deletion of beta-catenin reveals Wnt-dependent and Wnt-independent functions during development. *Curr Biol* **15**, 1677-83.

Ghaisas, M., Navghare, V., Takawale, A., Zope, V., Tanwar, M. and Deshpande, A. (2009). Effect of Tectona grandis Linn. on dexamethasone-induced insulin resistance in mice. *J Ethnopharmacol* **122**, 304-7.

Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A. et al. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* **38**, 320-3.

Heller, R. S., Dichmann, D. S., Jensen, J., Miller, C., Wong, G., Madsen, O. D. and Serup, P. (2002). Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Dev Dyn* 225, 260-70.

Hoppler, S. and Kavanagh, C. L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. J Cell Sci 120, 385-93.

Inuwa, I. M. and El Mardi, A. S. (2005). Correlation between volume fraction and volume-weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *J Anat* 206, 185-92.

Jin, T., George Fantus, I. and Sun, J. (2008). Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* **20**, 1697-704.

Kispert, A., Vainio, S. and McMahon, A. P. (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* **125**, 4225-34.

Li, F., Chong, Z. Z. and Maiese, K. (2005). Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res* **2**, 331-40.

Liu, H., Fergusson, M. M., Wu, J. J., Rovira, I. I., Liu, J., Gavrilova, O., Lu, T., Bao, J., Han, D., Sack, M. N. et al. (2011). Wnt signaling regulates hepatic metabolism. *Sci Signal* **4**, ra6.

Murtaugh, L. C. (2008). The what, where, when and how of Wnt/beta-catenin signaling in pancreas development. *Organogenesis* **4**, 81-86.

Murtaugh, L. C., Law, A. C., Dor, Y. and Melton, D. A. (2005). Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development. *Development* 132, 4663-74.

Paige, S. L., Osugi, T., Afanasiev, O. K., Pabon, L., Reinecke, H. and Murry, C. E. (2010). Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One* **5**, e11134.

Pedersen, A. H. and Heller, R. S. (2005). A possible role for the canonical Wnt pathway in endocrine cell development in chicks. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 961-8.

Schinner, S., Ulgen, F., Papewalis, C., Schott, M., Woelk, A., Vidal-Puig, A. and Scherbaum, W. A. (2008). Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* **51**, 147-54.

Schohl, A. and Fagotto, F. (2002). Beta-catenin, MAPK and Smad signaling during early Xenopus development. *Development* 129, 37-52.

Sone, H. and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58-67.

Strom, A., Bonal, C., Ashery-Padan, R., Hashimoto, N., Campos, M. L., Trumpp, A., Noda, T., Kido, Y., Real, F. X., Thorel, F. et al. (2007). Unique mechanisms of growth regulation and tumor suppression upon Apc inactivation in the pancreas. *Development* **134**, 2719-25.

Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A. and Shibasaki, M. (2011). Effects of antidiabetic drugs in high-fat diet and streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 655, 108-16.

Thompson, M. D. and Monga, S. P. (2007). WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* **45**, 1298-305.

Wells, J. M., Esni, F., Boivin, G. P., Aronow, B. J., Stuart, W., Combs, C., Sklenka, A., Leach, S. D. and Lowy, A. M. (2007). Wnt/beta-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas. *BMC Dev Biol* **7**, 4.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-53.

Winzell, M. S. and Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S215-9.

Yesil, P. and Lammert, E. (2008). Islet dynamics: a glimpse at beta cell proliferation. *Histol Histopathol* **23**, 883-95.

CONCLUSÕES GERAIS

• A dieta hiperlipídica por curto período de 60 dias induziu aumento de colesterol plasmático em animais WT e acentuou a hipercolesterolemia inata dos animais LDLr-/-. Além disso, os animais WT e LDLr-/- tornaram-se obesos, hiperglicêmicos, hiperinsulinêmicos e intolerantes à glicose caracterizando-os como pré-diabéticos.

• Em relação aos aspectos funcionais do pâncreas endócrino, a dieta hiperlipídica induziu redução na resposta secretora de insulina à glicose nos animais WT e LDLr-/-, em conseqüência do aumento na secreção basal de insulina em camundongos WT e a dimimuição na secreção estimulada em camundongos LDLr-/-. Ainda, este estudo mostrou que animais LDLr-/-, mesmo quando alimentados com dieta balanceada, apresentam secreção muito menor quando comparados com os animais WT, sugerindo que as células beta destes animais são menos sensíveis à glicose.

• A resposta secretora de insulina diminuída nas células beta dos animais WT e LDLr-/alimentados com dieta hiperlipídica foi associada com uma diminuição da expressão de Cx36 nas ilhotas, sugerindo uma participação das junções comunicantes no processo de pré-diabetes.

• As alterações metabólicas decorrentes da ingestão da dieta hiperlipídica resultaram, nos animais WT, em hiperplasia compensatória das células beta frente a uma maior demanda de insulina apresentada por estes animais. Ainda, o aumento da massa das células beta nestes animais foi principalmente decorrente da proliferação deste tipo celular, em relação à

neogênese. Já os animais LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica não exibiram alterações morfométricas no pâncreas endócrino, o que explica a menor hiperinsulinemia neste animais em relação àquela observada nos WT tratados com a mesma dieta.

• A análise das proteínas envolvidas na via de sinalização Wnt/beta-catenina nas ilhotas dos animais que apresentaram hiperplasia compensatória do pâncreas endócrino, induzida pela dieta hiperlipídica, revelou um aumento significativo no conteúdo celular de beta-catenina ativada (desfosforilada) e de ciclina D, sugerindo uma possível ativação desta via. Entretanto, o fato da beta-catenina total não ter sido imunodetectada no citoplasma e/ou núcleo das células beta nessas condições, indica que experimentos adicionais serão necessários para confirmar a ativação *in vivo* da via Wnt/beta-catenina no pâncreas endócrino.

DECLARACÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "PROLIFERAÇÃO E DISFUNÇÃO DA CÉLULA BETA PANCREÁTICA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELITO TIPO 2. ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA":

) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e (biosseguranca.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

) ClBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto nº (

(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto nº 1884-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

(

) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Ricarda Beltrami de diveira

Aluno: Ricardo Beltrame de Oliveira

Orientadora: Carla Beatriz Collares Buzato

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido

Jaurida Juorold Carimbo e assinatura